

Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion der Proteine MIA und MIA_{splice} in humanen Geweben

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG



vorgelegt von
Petra Wise aus Straubing
April 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 17. April 2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Armin Kurtz

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Hans R. Kalbitzer

1. Prüfer (Erstgutachter) Prof. Dr. Armin Kurtz

2. Prüfer (Zweitgutachter) Prof. Dr. Ulrich Bogdahn

3. Prüfer Prof. Dr. Peter Flor

Kolloquiumstermin: 13. Januar 2010

Diese Arbeit ist allen gewidmet,
die an die Fertigstellung derselben
geglaubt haben

Inhaltsangabe

1. Einleitung	1
2. Material & Methoden	22
1. Material	22
1.1. Chemikalien	22
1.2. Lösungen und Puffer	25
1.3. Medien zur Bakterienanzucht	33
1.4. Verwendete Molekularbiologische Systeme	34
1.5. Verwendete Restriktionsendonukleasen	35
1.6. Modifizierende Enzyme	36
1.7. Bakterienstämme und Plasmide	36
1.8. Zelllinien	36
1.9. Längenmarker	37
2. Methoden	38
2.1. Kultivierung von Bakterien	38
2.1.1. Anzucht von Bakterien	38
2.1.2. Gewinnung von kompetenten Bakterien	38
2.2. Kultivierung von humanen Zellen	39
2.2.1. Anzucht von Zellen	39
2.2.2. Kulturteilung	39
2.2.3. Einfrieren von Zellen	39
2.2.4. Bestimmung der Zellzahl	39
2.3. Präparation von Nukleinsäuren	40
2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA	40

2.3.1.1. Minipräparation aus 5 ml Kulturen	40
2.3.2. RNA-Extraktion aus Gewebe	41
2.3.3. DNA-Reinigung von PCR-Produkten oder nach Enzymbehandlung	41
2.3.4. DNA-Reinigung aus Agarosegelen	42
2.4. Restriktionsspaltung von DNA	42
2.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	42
2.5.1. Agarosegele	42
2.5.2. RNA-Gele	43
2.6. Gelelektrophorese von Proteinen	43
2.6.1 SDS-Page-Gele	43
2.7. Klonierung und Transformation	44
2.7.1. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase	44
2.7.2. Ligieren von DNA-Fragmenten	44
2.7.3. Transformation von <i>E. coli</i>	44
2.8. Northern Blotting	45
2.9. Radioaktiv-Markierung von DNA durch <i>random priming</i>	45
2.10. DNA-Hybridisierung	45
2.10.1. Benutzte Gensonde	45
2.10.2. Vorhybridisierung	45
2.10.3. Hybridisierung	47
2.10.4. Waschen der hybridisierten Membranen	47

2.11. Detektion	47
2.12. Synthese von Oligonukleotiden	48
2.13. DNA-Sequenzierung	48
2.14. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	48
2.14.1. Amplifizierung von MIA und MIA/Splice	48
2.14.2. cDNA screening mittels PCR	48
2.15. Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA	49
2.16. Western Blotting	49
2.17. Immunfärbung von Zellen	49
2.18. Immunfärbung von Gefrierschnitten	50
3. Ergebnisse	52
3.1. Klonierung von MIA-Splice	52
3.2. Expression von MIA und MIA/Slice in pQE-40	56
3.3. Northern Blotting	58
3.4. cDNA Screening	63
3.5. MIA und MIA/Splice Western Blot	69
3.6. MIA/Splice Antikörper Herstellung	71
3.7. Induktion von Chondrogenese mit MIA und TGF- β 1	75
3.8. mRNA Analyse mittels reverser Transkription	78
3.9. Immunhistologische Untersuchungen von MIA/Splice	80

3.9.1. Untersuchung von Chondrozytenkulturen	80
3.9.2. Untersuchung von Chondrozytenaggregaten	82
3.9.3. Untersuchung von melanozytären Gewebeschnitten	84
4. Diskussion	87
4.1. Expression in E. coli	87
4.2. Northern Blotting	89
4.3. cDNA Screening	90
4.4. Western Blot Analyse von MIA und MIA/Splice	92
4.5. Induktion von Chondrogenese mit MIA und TGF- β 1	93
4.6. TGF- β 1, MIA und MIA _{splice} mRNA Analyse von Chondrozytenaggregaten mittels reverser Transkription	95
4.7. Immunhistologische Untersuchungen von MIA/Splice	96
4.7.1. Untersuchung von Chondrozytenkulturen	96
4.7.2. Untersuchung von Chondrozytenaggregaten	97
4.7.3. Untersuchung von melanozytären Gewebeschnitten	97
5. Zusammenfassung	98
6. Literaturverzeichnis	99
Anhang	109

Einleitung

1. Einleitung

Ursachen der Tumorentstehung

Die Zellvermehrung und Zellteilung eines gesunden Organismus unterliegt der präzisen Kontrolle des Zellzyklus. Tumorentstehung dagegen ist unter anderem das direkte Resultat einer Störung desselben.

Die Regulation der Tumorprogression ist gesteuert durch ein komplexes Netzwerk inhibierender und stimulierender Faktoren, die von der Tumorzelle wie auch der direkten Umgebung gebildet werden. Viele dieser Faktoren sind im gesunden Organismus für den korrekten Ablauf des Zellzyklus verantwortlich oder für die Differenzierung und Funktion der adulten Zelle im Gewebeverband.

Durch die Entdeckung von Onkogenen und Protoonkogenen und die folglich folgende Entdeckung von Tumorsuppressoren und Mutationsgenen kam es zu einem signifikanten Fortschritt im Verständnis der Mechanismen der Karzinogenese. Onkogene sind zelluläre oder virale Gene; ihre Expression kann die Entwicklung eines Neoplasmas verursachen. Protoonkogene sind normale zelluläre Gene, ihre Umwandlung in Onkogene kann durch verschiedene Mechanismen wie Amplifikation oder Modifikation erfolgen. Tumorsuppressoren (Anti-Onkogene, rezessive Tumorgene) sind zelluläre Gene. Ihre Inaktivierung erhöht die Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung, wogegen die Wiederherstellung ihrer Funktion das Wachstum von Tumorzellen zu unterdrücken vermag. So genannte Mutationsgene, die mit den Tumorsuppressoren verwandt sind, können dagegen das Tumorstadium nicht beeinflussen. Jedoch erhöht eine Störung ihrer Funktion die Rate der Mutationen und/oder anderer genetischer Anomalien. Inaktivierung dieser Gene erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens verschiedener onkogener Mutationen so stark, dass eine Tumorbildung früher oder später eintritt.

Es gibt wenige Kriterien, die Onkogene und Tumorsuppressoren definieren:

- a) passende Veränderungen der Struktur und/oder Expression eines gewünschten Gens in einer bestimmten oder verschiedenen Tumorzellen;

Einleitung

- b) Auftreten bestimmter Tumoren in jugendlichen oder jungen Individuen mit ererbten Keimzellmutationen eines gewünschten Gens;
- c) scharfer Anstieg der Tumorrates in transgenen Mäusen die entweder die aktivierte Form des gewünschten Gens exprimieren (im Falle der Onkogene) oder knockout-Mutationen eines gewünschten Gens tragen (im Fall von Tumorsuppressoren);
- d) die Fähigkeit morphologische Transformation und/oder unlimitedes Wachstum zu verursachen (Onkogene) und/oder Manifestationen von Transformationen (Tumorsuppressoren) in kultivierten Zellen *in vitro*.

Die letzten zwei Dekaden sind durch die Entdeckung zahlreicher Onkogene und Tumorsuppressoren geprägt. Bisher wurden circa hundert potentielle Onkogene (zellulär und viral) und zwanzig Tumorsuppressoren entdeckt. Genetische Ereignisse, die zur Aktivierung von Protoonkogenen oder der Inaktivierung von Tumorsuppressoren führen, wurden ebenfalls beschrieben (Bishop, 1991; Levine, 1993; Weinberg, 1995; Hunter, 1997; Hooper, 1998). Der Mechanismus des Effekts viraler Onkogene schließt die Aktivierung zellulärer Protoonkogene (Retroviren) oder die Inaktivierung von Tumorsuppressoren (DNA Viren) ein (Dyson et al., 1989; Sugden, 1993; Hoppe-Seyler und Butz, 1995; Flint und Shenk, 1997; Scarpa und Tognon, 1998). Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressoren, die typisch für bestimmte Formen humaner Neoplasien sind, wurden erkannt und einige hochspezifische Anomalien werden in der Diagnose eingesetzt (Sanchez, 1997).

Die überwältigende Mehrheit der bekannten Onkogene und Tumorsuppressoren sind Komponenten einiger weniger gemeinsamer Signalwege, die den Zellzyklus, Apoptose, Genomintegrität, morphologische Reaktionen und die Zelldifferenzierung regulieren. Dies scheint die Hauptaufgabe von Onkogenen und Tumorsuppressoren zu sein.

Anormale Funktion von Tumorsuppressoren und Protoonkogenen spielt eine Schlüsselrolle beim Auftreten von neoplastischen Zellen. Vor kurzem haben Studien Signalwege identifiziert, die von den meisten dieser Gene kontrolliert werden. Ein Großteil davon reguliert die Aktivität derselben Signalwege auf unterschiedlichen Niveaus der Signaltransduktion. Einige dieser Signalwege sind gleichzeitig in die Regulation einiger der wichtigsten physiologischen Prozesse verwickelt. Die Aktivierung der Raf-MAP-Kinase - Kaskade z. Bsp. stimuliert nicht nur den Eintritt in die S-Phase sondern auch Änderungen in der Form und Motilität der Zellen; in

Einleitung

einigen Zellen verhindert sie Apoptose. Produkte einiger Tumorsuppressoren und Protoonkogene sind Schlüsselpunkte in der Querverknüpfung verschiedener Signalwege. So interagiert aktiviertes p53 z. Bsp. als Antwort auf verschiedene Schädigungen, Stress oder normale regulatorische Effekte mit verschiedenen Zielen und kontrolliert Apoptose, Zellzykluspassagen, Genomstabilität, morphogene Reaktionen und Zellzyklusdifferenzierung. Ras-Protein spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Teilung, dem Überleben und der Differenzierung der Zelle, deren Interaktionen mit der Extrazellulärmatrix (ECM) und Lokomotion: diese Effekte werden realisiert über die Aktivierung von Raf, PI3K und RalGDS. Dies erklärt die hohe Verbreitung von Veränderungen in RAS und p53 Genen, die in verschiedenen Tumoren erkannt werden können. Mutationen in diesen Genen erlauben es, einige wichtige Stadien auf dem Weg der Tumorprogression zu überwinden und einige von der Tumorzelle benötigte Eigenschaften zu erwerben.

Einige Neoplasmen werden durch spezielle genetische Veränderungen charakterisiert, die typisch sind für diese Krankheit. Dies sind z. B. Chromosomentranslokationen, die aus der Transposition von Protoonkogenen und/oder Tumorsuppressoren des Genoms resultieren. Die Spezifität solcher Änderungen kann durch die folgenden Gründe erklärt werden.

- 1) Bestimmte Zelltypen werden durch erhöhte Wahrscheinlichkeit einiger genetischer Reorganisationen charakterisiert. Während der B-Zell-Differenzierung tritt z. Bsp. eine programmierte Reorganisation der Immunglobulin-Gene auf. Chromosomentranslokationen, die Immunglobulingene mit *MYC*-Protoonkogenen verbinden sind ein typischer Fehler solcher Reorganisationen. Das *MYC*-Protoonkogen enthält spezifische Signalsequenzen, die von Rekombinasen erkannt werden, die das Immunglobulin-Gen reorganisieren. Eine Hypothese besagt daher, dass in B-Lymphozyten-Vorläufern solche Translokationen, die die normale Regulation des Myc-Proteins verschlechtern, öfter vorkommen als andere Mutationen, die zu denselben biologischen Sequenzen führen.
- 2) Expression oder Effekte bestimmter Onkogene/Tumorsuppressoren mögen Gewebe-spezifisch sein.
- 3) Verschiedene Zelltypen benötigen unterschiedliche Sets biologischer Eigenschaften zum Erwerb des malignen Phänotyps. Im Falle von hämopoetischen Zellen z. Bsp. ist der Erwerb solcher Anzeichen wie

Einleitung

Verlust der Kontaktinhibition und beweglicher Phänotyp weniger wichtig als im Vergleich zu anderen Zellen. Stimulation der Proliferation und Inhibition der Apoptose und Blockade spezifischer Differenzierung sind entscheidende Merkmale, die die maligne Transformation der hämatopoetischen Zellen bestimmen.

Nach der Transformation der Zellen kommt es zur malignen Progression, worunter man die Ausbreitung der Tumorzellen im Organismus versteht. Dabei lassen sich verschiedene Schritte unterscheiden:

- a) Der Übergang von normalem Gewebe zum Primärtumor *in situ* ist durch eine zunehmende Entdifferenzierung gekennzeichnet, die sich unter anderem in einer veränderten Zellform, einer gestörten Position der Zellen zueinander und einem zunehmenden Verlust der Gewebestruktur äußert.
- b) Im weiteren Verlauf der Progression wandern die Tumorzellen in das umgebende Bindegewebe ein. Sie bewegen sich in Lymphspalten und Bindegewebe weiter (Invasion) und können aktiv Bestandteile des Bindegewebes abbauen (Destruktion).
- c) Aus vorhandenen Blutgefäßen sprossen Kapillaren in den wachsenden Primärtumor ein (Angiogenese) und es bildet sich ein bindegewebiges Stroma (Desmoplasie).
- d) Mit dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, die für den Zusammenhalt des normalen Gewebes verantwortlich ist, kann man in invasiv wachsenden Karzinomen Tumorzellnester oder einzelne Tumorzellen beobachten, die sich aus dem Zellverband gelöst haben.
- e) Der erste Schritt zur Metastasierung ist der Einbruch von Tumorzellen in die Lymphe und/oder Blutgefäße. Dringen Tumorzellen in die Lymphabflusswege ein, bilden sich zunächst Ansiedelungen in den regionären Lymphknoten. Über die Lymphabflusswege bzw. infiltrierte Blutgefäße gelangen Tumorzellen in die Blutbahn. In Tumorzellen, die in der Blutbahn überleben, müssen Mechanismen zum Schutz gegen Apoptose aktiv sein, da in adhärent wachsenden Zellen, die den Substratkontakt verlieren, in der Regel Apoptose ausgelöst wird.
- f) In etwa 90% der Fälle bilden sich Fernmetastasen in denjenigen Kapillarbetten, in die die Tumorzellen entsprechend der anatomischen Lokalisation des Tumors zuerst gelangen. Dies kann über eine Empolisierung der Endstrombahn oder durch Adhärenz an das Endothel geschehen.

Einleitung

- g) Die Tumorzellen durchdringen das Endothel mit der endothelialen Basalmembran, invasieren das subendotheliale bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf das Parenchym des betreffenden Organs. Hier bilden sich schließlich solide Metastasen heran.

Der Kontakt von Zellen multizellulärer Organismen wird durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt. Zelladhäsionsmoleküle regulieren die dynamischen Prozesse der Morphogenese im Verlauf der Embryonalentwicklung und der Regeneration von Organen. Sie bestimmen ferner die Gewebs- und Organarchitektur. Mobile Zellen wie zum Beispiel Granulozyten bewegen sich mittels Zelladhäsionsmolekülen an denjenigen Ort des Körpers, an dem die Zellen in physiologischen und pathologischen Situationen benötigt werden (Gumbiner, 1996).

Zelladhäsionsmoleküle vermitteln den Kontakt von Zellen untereinander und die Adhärenz von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM). Sie sind ebenso an allen Schritten der malignen Progression beteiligt. Durch Verlust und Dysregulation geht die geordnete Gewebsstruktur verloren, Tumorzellen lösen sich aus dem Gewebeverband. Voraussetzung für die Infiltration bindegewebiger Strukturen ist die Expression von Adhäsionsmolekülen, die an Bestandteile der ECM binden. Die Bindung von Zellmembranrezeptoren lymphogen metastasierender Tumorzellen an Liganden der Lymphgefäße von Lymphknoten ist eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen. Hämatogen metastasierende Tumorzellen können über Zelladhäsionsmoleküle an Endothelzellen und die endotheliale Basalmembran binden und damit die Ausbildung von Fernmetastasen einleiten (Brodt, 1996).

Cadherine

Die Cadherine sind eine Familie strukturell verwandter Proteine. Mitglieder dieser Familie sind die so genannten klassischen Cadherine und die Adhäsionsmoleküle von Desmosomen, die Desmogleine und Desmocolline (Mars und Nelson, 1996). Die Bezeichnung Cadherin resultiert aus dem Zusammenziehen des Begriffs „Calcium-abhängiges Adherin“. Diese Bezeichnung impliziert, dass Cadherine Adhäsion nur in Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen vermitteln. Ferner ist die Cadherin-abhängige Adhäsion temperaturabhängig und bei Körpertemperatur maximal. Die von Cadherinen vermittelte Zelladhäsion ist ein dynamischer Prozess, der einerseits von der Topologie und dem Differenzierungsstadium der Zellen abhängt und andererseits darauf

Einleitung

zurückwirkt. Cadherine sind somit nicht nur Adhäsions- sondern auch Signalmoleküle.

Zu den klassischen Cadherinen zählen E-Cadherin (epitheliales Cadherin), P-Cadherin (plazentales Cadherin) und N-Cadherin (neurales Cadherin). Die Assoziation von Cadherinen ist homophil. Ligand und Rezeptor sind strukturell identisch. Die homophile Bindung der Cadherine ist in der Regel spezifisch, das heißt E-Cadherin bindet an das identische Cadherin, nicht jedoch an ein anderes.

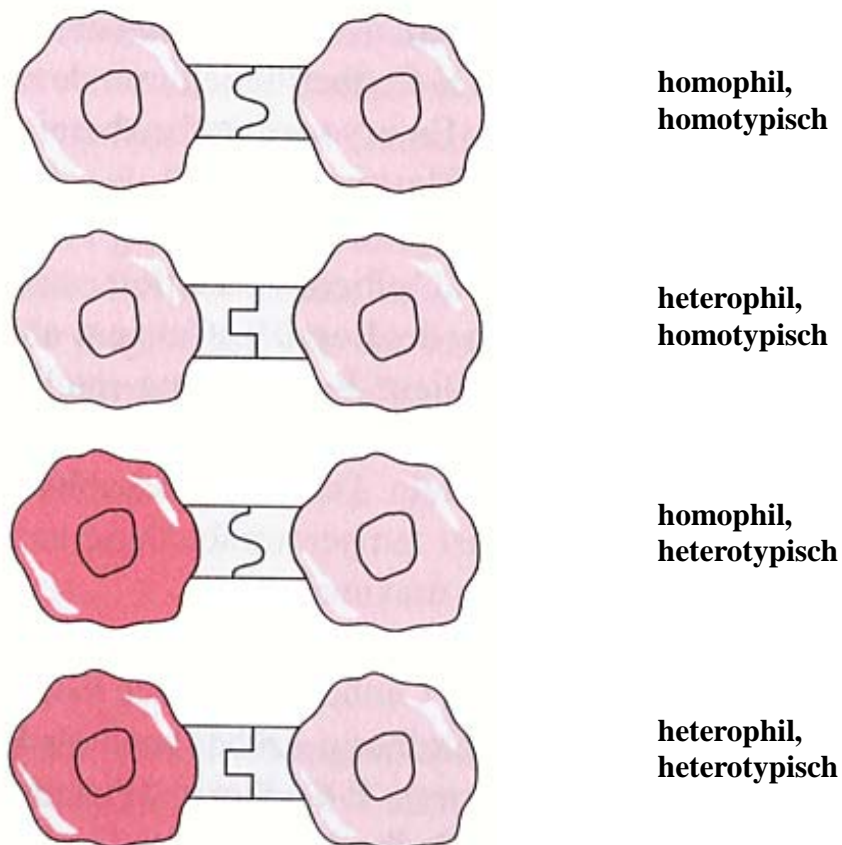


Abb.1.1: Schematische Abbildung verschiedener Arten der durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Aktionen.

Im Rahmen des Zell-Zell-Kontakts können Adhäsionsmoleküle an identische Moleküle der Partnerzelle binden. Eine solche Bindung bei der Ligand und Rezeptor gleich

Einleitung

sind, wird als homophile Bindung bezeichnet. Sind Ligand und Rezeptor verschieden, handelt es sich um eine heterophile Bindung. Eine weitere Unterscheidung der Zell-Zell-Erkennung betrifft die Art der Zellen. Die Adhärenz von Zellen der gleichen Zellart wird homotypisch, die Adhärenz verschiedener Zellarten heterotypisch genannt. (Nach Wagner, modifiziert)

Integrine

Die Mitglieder der Integrin-Familie vermitteln die Bindung von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix, an Zelladhäsionsmoleküle sowie an Komponenten des Blutgerinnungs- und Komplementsystems. Integrine besitzen einen zentralen Stellenwert für die Struktur von Epithelien und Endothelien, für den Aufbau von Bindegewebe sowie für Entzündungsreaktionen und Wundheilung (Ruoshlati, 1991; Hynes, 1992).

Alle Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Es gibt mindestens 16 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten. Bisher sind 22 verschiedene Kombinationen von α - und β -Untereinheiten bekannt. Integrine kommen ubiquitär in den verschiedensten Körperzellen vor. Eine Zellart kann verschiedene Integrine exprimieren, manche finden sich in vielen unterschiedlichen Zellarten, andere sind hingegen spezifisch für eine bestimmte Zellart. Die Bindungsaffinität von Integrinen für Liganden hängt von der Konformation der Untereinheiten und der Zusammenlagerung (Clusterbildung) der Integrine ab. Der Affinitätsstatus wird durch intrazelluläre Signale reguliert (Keely et al, 1998). Den veränderten Bindungseigenschaften liegt eine Konformationsänderung zugrunde. Die Modulation der Bindungseigenschaften wird als „Inside-out-signalling“ bezeichnet. Bei der Verstärkung der Bindung von Integrinen an Liganden der ECM durch Clustern spielt insbesondere RHO, ein GTPase der RAS-Familie, eine wichtige regulatorische Rolle.

Einleitung

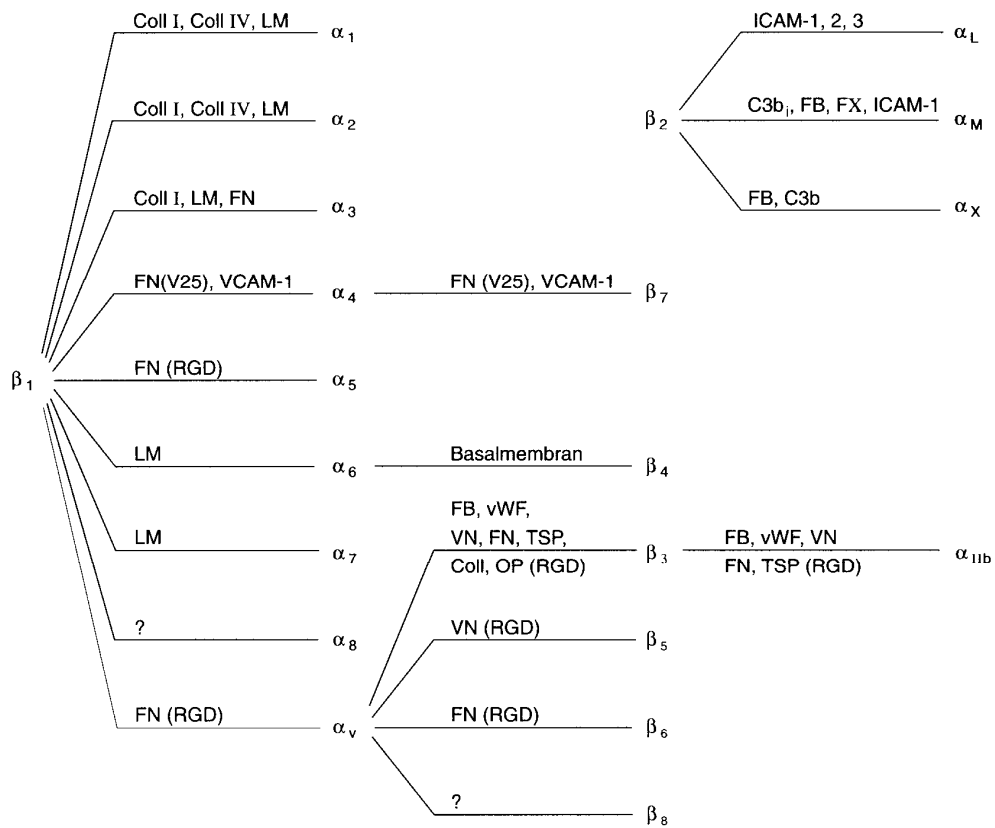


Abb.1.2: Mitglieder der Integrin-Familie und ihre Liganden

Integrine sind essentiell für die Struktur und Aufbau von Geweben. Einige der Integrine erkennen RGD-Sequenzen, die restlichen nicht (nach Ruoshtati, 1991 und Hynes, 1992).

Einleitung

Immunglobulin-Superfamilie

Mitglieder der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie sind direkt oder indirekt an der Immunabwehr und der Zell-Zell-Erkennung beteiligt. Aber auch Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehören zur Ig-Superfamilie. Die Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie werden als Ig-CAMs (CAM = Cell Adhesion Molecule) bezeichnet (Williams und Barclay, 1988). Das gemeinsame Strukturmerkmal der Ig-Superfamilie ist der so genannte Immunglobulin-Gold, dessen dreidimensionale Struktur zuerst in Immunglobulinen aufgeklärt wurde (Williams und Barclay, 1988).

Die Domänen von Zelladhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie können an Proteindomänen und Kohlenhydratstrukturen binden. Zwischen Mitgliedern der Superfamilie kommen sowohl homophile als auch heterophile, durch Ig-Domänen vermittelte Interaktionen vor. Protein-Protein-Wechselwirkungen finden sich auch zwischen Vertretern der Immunglobulin-Familie und Zelladhäsionsmolekülen anderer Familien wie zum Beispiel den Integrinen. Zu den Kohlenhydratstrukturen, die von Ig-Domänen erkannt werden, gehören Heparansulfat, terminale N-Acetyl-Neuraminosäuren und High-Mannose-Reste (Kelm et al, 1996).

Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie spielen in vielen physiologischen Prozessen eine Rolle, wie bei der Differenzierung von Neuronen. Als Rezeptoren für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gehören die PDGF-, FGF- und VEGF-Rezeptoren zur Immunglobulin-Superfamilie.

Selectine

Selectine binden Kohlenhydrate und gehören somit zur Gruppe der Lectine. Der Begriff „Selectin“ steht dementsprechend für „Selective lectin-dependent cell adhesion molecule“. Selectine spielen eine bedeutende Rolle für die Bindung von Leukozyten an das Endothel und wurden in diesem Zusammenhang zum ersten Mal beschrieben (Tedder, 1995).

Man unterscheidet drei strukturell verwandte Selectine, die entsprechend ihrem Vorkommen als L (Leukozyten)-, E (Endothel)- und P (Platelet)-Selectine bezeichnet werden. Sie besitzen eine vergleichbare Struktur. L-Selectin ist ein so genannter Homing-Rezeptor, der Leukozyten in Lymphknoten dirigiert. E-Selectin vermittelt

Einleitung

die Bindung von Granulozyten und Monozyten an Endothelien in entzündeten Geweben. P-Selectin spielt sowohl im Rahmen von Entzündungen als auch bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle.

CD44

CD44 bezeichnet eine Gruppe heterogener Glykokonjugate, die in unterschiedlichen Formen in den verschiedensten Zellen und Geweben gebildet werden. Strukturell und funktionell gehört CD44 zur Familie der Hyaluronsäure-bindenden Hyaladherine. Weitere Mitglieder dieser Familie sind das Link-Protein des Knorpels sowie die Proteoglykane Aggrecan und Versican. Die meisten Funktionen von CD44 betreffen den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt. Hyaluronsäure ist der wichtigste DC44-Ligand. Weitere Liganden sind Laminin, Fibronectin, Kollagen und Osteopontin. Die Interaktion von zellulärem CD44 mit Hyaluronsäure sowie mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix unterstützt die Wanderung von Zellen durch die ECM und die Ansiedlung in bestimmten Gewebekompartimenten.

Proteinasen

Proteinasen werden entsprechend struktureller Eigenschaften des enzymatisch aktiven Zentrums, Unterschieden im pH-Optimum, Abhängigkeit von Kationen und der Empfindlichkeit gegen Inhibitoren in Serin-, Cystein- bzw. Thiol-, Carboxyl- und Metalloproteinasen eingeteilt. Den Serin- und Metalloproteinasen kommt im Rahmen der malignen Progression für den Abbau von Bestandteilen des Bindegewebes ein besonderer Stellenwert zu.

uPA-System

Die zentralen Funktionen des uPA/Systems sind die Fibrinolyse und die Wundheilung. Für die Narbenbildung als Abschluss der Wundheilung ist eine umfangreiche Neu- und Umbildung des Bindegewebes erforderlich. Hauptsubstrate von Plasmin, dem Effektorenzym des uPA-Systems, sind daher neben Fibrinogen und Fibrin Bestandteile der extrazellulären Matrix. Im Verlauf der malignen Progression machen sich Tumorzellen das uPA-System zunutze. Dies wurde sowohl experimentell als auch durch den Nachweis von Komponenten des uPA-Systems in humanem Tumorgewebe belegt (Andreasen et al, 1997).

Einleitung

Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) umfassen eine Gruppe sezernierter oder membranständiger Enzyme, die Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes und der Basalmembran abbauen können. Unter physiologischen Bedingungen sind die Enzyme an der Remodelierung des Bindegewebes zum Beispiel im Verlauf der Embryogenese sowie von Wachstum und Involution hormonabhängiger Organe beteiligt.

Basierend auf ihrer Substratspezifität wurden MMPs in drei Gruppen unterteilt: Kollagenasen bauen fibrilläre Kollagene ab. Bevorzugte Substrate der Stromelysine sind Proteoglycane und Glycoprotein. Gelatinasen degradieren schließlich nicht-fibrilläre und denaturierte fibrilläre Kollagene.

Charakteristika des Melanoms

In den letzten Jahren konnte ein starker Anstieg des Auftretens des malignen Melanoms festgestellt werden, hauptsächlich bei dem kaukasischen Anteil der Bevölkerung. Hier sollen die neuesten Ergebnisse der Erforschung des malignen Melanoms dargestellt werden.

Genetische Ursachen des malignen Melanoms

In letzter Zeit ist es gelungen, einige genetische Veränderungen aufzudecken, die zur Entwicklung und Progression des malignen Melanoms führen.

Durch Kopplungsanalysen in familiären Melanomfällen gelang es, auf dem Chromosomlokus 9p21 das Gen *CDKN2A* (Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A) als ein mögliches Melanom-verursachendes Gen zu entdecken. Dieses Gen kodiert für die Proteine p16 oder INK4A (Inhibitor der Kinase A), das CDK4 (Cyclin-abhängige Kinase 4) durch ein Konkurrieren mit Cyclin D1 um die Bindung von CDK4 inaktiviert. Cyclin D1/CDK4 Komplexe phosphorylieren und inaktivieren RB (Retinoblastom-Genprodukt), woraus die Dissoziation des E2F Faktors resultiert. E2F ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Expression von S-Phasen Gene benötigt wird. *CDKN2A* spielt also eine wichtige Rolle am G1-Checkpoint des Zellzykluses und

Einleitung

wird somit genau wie *RB* als Tumorsuppressorgen bezeichnet. Veränderungen des *CDKN2A/CDK4* Signalweges spielen somit eine wichtige Rolle in der Entwicklung des malignen Melanoms.

Schon 1989 wurde über eine Verknüpfung des Chromosomlokus 1p36 zu Fällen von familiärem malignen Melanoms berichtet (Bale et al, 1989). Später berichteten Ariza et al, dass die Expression des Gens *cdc2*, das auf 1p36 lokalisiert ist und für das PITSLRE-Protein kodiert, in Melanomzellen mit Resistenz zur Fas-vermittelten Apoptose verändert ist (Ariza et al, 1999).

Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10q wird regelmäßig in primären Melanomen mit relativ dünner Tumordicke beobachtet. Das Gen *PTEN/MMAC1*, lokalisiert auf Genlokus 10q23.3, welches das das Cowden's Syndrom auslöst. Dieses wiederum entwickelt viele verschiedene Arten von Tumoren. *PTEN/MMAC1* ist in mehr als 40% der Melanomzelllinien mutiert oder deletiert (Guldborg et al, 1997). Eine Dysfunktion dieses Gens wird häufig auch in Gliomen beobachtet, was nicht überrascht, da sowohl der Ursprung von glialen Zellen als auch Melanozyten in der Neuralleiste liegt. *PTEN/MMAC1* kodiert ein 55 kDa großes Protein mit Tyrosinphosphatase-Aktivität und wird als Tumorsuppressor-Gen betrachtet. Jüngsten Untersuchungen zufolge scheint es, dass dieses Gen nicht in frühe Entwicklungsstufen von Melanomen verwickelt ist, sondern in spätere Progressionsschritte.

In primären Melanomen großer Tumordicke und in metastasierenden Melanomen wird häufig ein LOH des Chromosomlokuses 6q beobachtet, was zur Identifizierung des Gens *AIM1*, lokalisiert auf Chromosom 6q21, führte. Es gehört zu der $\beta\gamma$ -Crystallin-Superfamilie und Teile der AIM1-Proteinsequenz haben leichte Ähnlichkeit mit Aktin-bindenden Proteinen (Ray et al, 1997). Die Effekte von AIM1 könnten also durch Interaktionen mit dem Zytoskelett erfolgen. Defekte dieses Gens bei Melanomen dürften in die Entwicklung der vertikalen Tumorstadiumsphase (VGF) und die Metastasierung involviert sein.

Über die Mutationsraten von *ras*-Genen in humanen Melanomen liegen unterschiedliche Zahlen vor. *In vitro* konnte jedoch gezeigt werden, dass humane Melanozyten der radialen Wachstumsphase (RGP) mit geringem invasivem Potential durch Transfektion mit mutierten *N-ras*- oder *H-ras*-Genen Charakteristika von VGP-Melanomen erlangen. Dazu zählen Adhäsions-unabhängige Proliferation, erhöhte Beweglichkeit, Invasivität im in-vitro-Assay und Tumorbildung in Nacktmäusen.

Einleitung

Außerdem überwinden die Transfektanten den Wachstums-inhibitorischen Effekt, den TGF- β in normalen Melanozyten genau wie in Melanozyten frühen Stadiums auslöst. Dies deutet darauf hin, dass aktiviertes *ras* eine entscheidende Rolle der Tumorprogression von der PGP zur VGP.

Im Gegensatz dazu wird eine Deletion des bekannten Tumorsuppressors *p53*, die häufig in verschiedensten Tumoren auftritt, im malignen Melanom äußerst selten beobachtet. Dies kann sich durch die überlappenden Tumorsuppressor-Funktionen von *CDKN2A* und *p53* erklären.

Die Rolle von Adhäsionsmolekülen in Melanomzellen

Die Gruppe um Herlyn identifizierte in Mel-CAM/MUC18 einen Adhäsionsrezeptor von Melanozyten (Shih et al, 1994, 1997). Die Expression dieses Rezeptors ist in Melanocyten hochreguliert und spielt nicht nur eine wichtige Rolle in Melanomzell – Melanomzell-Interaktionen, sondern auch in Melanom - endothelialen Interaktionen. Mel-CAM/MUC18 scheint in Verbindung mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zu agieren, einem Vitronectin-Rezeptor, der die Metastasierung fördert. Überexpression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins in Melanomzelllinien der radialen Wachstumsphase *in vitro* verändert die Merkmale der Zellen zu solchen der vertikalen Wachstumsphase.

Cadherine agieren als homophile, Kalzium-abhängige Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle und sind an der Zellerkennung, der Motilität und der Gewebeintegrität beteiligt. In normaler Haut wird E-Cadherin an der Oberflächen der unterschiedlichsten Epidermalzellen exprimiert, an Keratinozyten, Melanozyten und Langerhans Zellen. P-Cadherin wird im Kontrast dazu nur auf der Oberfläche von Keratinozyten der Basalschicht exprimiert. N-Cadherin wird in der Haut von Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert, nicht aber von Keratinozyten und Melanozyten. Während der Melanom-Entwicklung findet man starke Veränderungen des Cadherin-Expressionsmusters. Die Proliferation normaler Melanozyten wird augenscheinlich unter anderem durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit Keratinozyten kontrolliert. Im Gegensatz dazu entziehen sich Melanomzellen der Wachstumsinhibition durch Keratinozyten, wahrscheinlich aufgrund des Verlusts der E-Cadherin Expression. Durch Transduktion von E-Cadherin-DNA in E-Cadherin-negative Melanomzellen lässt sich die Fähigkeit zur Zelladhäsion an Keratinozyten wiederherstellen, durch die erzwungene E-Cadherin - Expression werden die Gap Junctions zwischen Keratinozyten und Melanozyten wiederhergestellt.

Einleitung

Faktoren der Invasion und Metastasierung von Melanomen

Das maligne Melanom hat ein extrem hohes Metastasierungspotenzial, was eine Reihe von Gründen hat. Zwei Faktoren sind unerlässlich für die lokale Invasion und die hämatogene Metastasierung von Melanomen: Änderungen der Matrix-Metalloproteinase-Aktivität und die Charakteristika der Gefäßentwicklung in Melanomen.

Die Degradation der Basalmembranen und der ECM ist ein essentieller Schritt der Tumorprogression und der Metastasierung. Bei diesem Schritt spielen Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihre Gewebeinhibitoren (TIMP) eine Schlüsselrolle. MMPs sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die ECM-Komponenten abbauen. TIMPs modulieren die Aktivität der MMPs durch Bindung an ihre katalytische Domäne. Sie inhibieren nicht allerdings nur, sondern können auch die Überführung der MMPs in ihre aktive Form fördern.

Im Falle des malignen Melanoms kann eine erhöhte Expressionsrate von MMP-1, MMP-2 und MMP-9 mit einem invasivem Phänotyp korreliert werden, TIMP-1 dagegen scheint die Produktion von MMP-9 in Melanomzellen zu inhibieren. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin kann die aktive MMP-2 an der Melanom-Zelloberfläche binden und positionieren. Außerdem wurden die membranständige MMP (MT1-MMP) und $\alpha_v\beta$ gemeinsam auf der Zellmembran von Melanomzellen lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass MT1-MMP eine Rolle bei der Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -gebundener MMP-2 spielt.

Eigenschaften der Gefäßentwicklung des malignen Melanoms

Die hohe Wahrscheinlichkeit der Entwicklung hämatogener Metastasen in frühen Stadien ist ein Charakteristikum des malignen Melanoms. Unterschiedlichen Untersuchungen zufolge haben Patienten mit starker Vaskularisierung in primären Melanomen eine schlechtere Prognose. Maniotis et al (1999) haben außerdem das Konzept einer vaskulären Mimikry vorgeschlagen. In metastatischen Läsionen aggressiver Melanome findet man häufig ein ausgeprägtes Netzwerk von miteinander verbundenen Schleifen extrazellulärer Matrix. Diese Kanäle enthalten oft rote Blutkörperchen, obwohl sie nicht von Endothelzellen gebildet werden, sondern von Melanomzellen. Dies führt zur Hypothese, dass aggressive Melanome diese Kanäle

Einleitung

bilden, um die Tumorperfusion unabhängig von wirklicher Angiogenese zu vereinfachen.

Die Rolle von MIA im malignen Melanom

Mit der Intention, zelleigene Faktoren zu charakterisieren, welche das Tumorzellwachstum inhibieren, wurde MIA in unserer Arbeitsgruppe (Blesch et al, 1994) entdeckt. Hierfür wurde die Zelllinie HTZ-19 verwendet, die aus einer langsam wachsenden Hirnmetastase eines malignen Melanoms etabliert worden war. Zellkulturüberstände wurden hinsichtlich wachstumsinhibitorischer Aktivitäten untersucht, eine dieser Aktivitäten erwies sich als bis dahin unbekanntes Protein und wurde aufgrund seiner proliferationsinhibitorischen Eigenschaft *in vitro* als „melanoma inhibitory activity“ (MIA) bezeichnet.

Nach Isolierung eines vollständigen kodierenden cDNA-Klons zeigte sich, dass die Sequenz einen 396-bp-langen kodierenden Bereich umfasst, sowie eine 70 bp 5' untranslatierte Region (UTR) und eine 67 bp 3' UTR, an die sich der poly(A)-Schwanz der reifen mRNA anschließt. Bis heute sind die humane, murine, bovine und die Ratten-Sequenz von MIA bekannt und die Homologie innerhalb der Proteine ist sehr hoch. Es handelt sich bei MIA also um ein in der Evolution stark konserviertes Protein, was auf eine essentielle zelluläre Funktion hinweist.

Einleitung

```

5' C GGC ACG GGG AGA GAG GGA GGG GAG GAA ATT GGA GAC CCC AGC

ACC CCC TTC TCA CTC TCT TGC TCA CAG TCC ACG Met Ala Arg Ser
ATG GCC CGG TCC

Leu Val Cys Leu Gly Val Ile Ile Leu Leu Ser Ala Phe Ser Gly
CTG GTG TGC CTT GGT GTC ATC ATC TTG CTG TCT GCC TTC TCC GGA

Pro Gly Val Arg Gly Gly Pro Met Pro Lys Leu Ala Asp Arg Lys
CCT GGT GTC AGG GGT GGT CCT ATG CCC AAG CTG GCT GAC CGG AGG

Leu Cys Ala Asp Gln Glu Cys Ser His Pro Ile Ser Met Ala Val
CTG TGT GCG GAC CAG GAG TGC AGC CAC CCT ATC TCC ATG GCT GTG

Ala Leu Gln Asp Tyr Met Ala Pro Asp Cys Arg Phe Leu Thr Ile
GCC CTT CAG GAC TAC ATG GCC CCC GAC TGC CGA TTC CTG ACC ATT

His Arg Gly Gln Val Val Tyr Val Phe Ser Lys Leu Lys Gly Arg
CAC CGG GGC CAA GTG GTG TAT GTC TTC TCC AAG CTG AAG GGC CGT

Gly Arg Leu Phe Trp Gly Gly Ser Val Gln Gly Asp Tyr Tyr Gly
GGG CGG CTC TTC TGG GGA GGC AGC GTT CAG GGA GAT TAC TAT GGA

Asp Leu Ala Ala Arg Leu Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Ile Val Arg
GAT CTG GCT GCT CGC CTG GGC TAT TTC CCC AGT AGC ATT GTC CGA

Glu Asp Gln Thr Leu Lys Pro Gly Phe Val Asp Val Lys Thr Asp
GAG GAC CAG ACC CTG AAA CCT GGC TTT GTC GAT GTG AAG ACA GAT

Lys Trp Asp Phe Tyr Cys Gln Stop
AAA TGG GAT TTC TAC TGC CAG TGA GCT CAG CCT ACC GCT GGC CCT

GCC GTT TCC CCT CCT TGG GTT TAT GCA AAT ACA ATC AGC CCA GTG

CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 1.3: Humane MIA-cDNA-Sequenz

Die MIA-cDNA umfasst einen 396 bp langen kodierenden Bereich, 70 bp 5' UTR und 67 bp 3' UTR, dem sich der poly(A)-Schwanz der reifen mRNA anschließt. Die

Einleitung

Translation der Sequenz resultiert in einem 131 Aminosäure langen Vorläuferprotein. Unterstrichen ist die Signalsequenz, die die Sekretion des Proteins steuert und vom nativen Protein abgespalten wird.

Das Protein Mia wird als ein 131-Aminosäuren langes Vorläuferprotein translatiert (Abb. 1.3). Die Signalsequenz, eine hydrophobe Sequenz von 24 Aminosäuren, ist für den Transport des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich und wird dort abgespalten. Anschließend wird MIA von der Zelle in den Extrazellularraum sezerniert. Das reife Protein besteht aus 107 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 11 kDa. Neben der Signalsequenz besitzt MIA vier weitere stark hydrophobe Bereiche und bildet wahrscheinlich eine globuläre Struktur aus, die durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert werden.

Das humane wie auch das murine MIA-Gen besteht aus vier Exonen und erstreckt sich über ca. 2 kb. Das humane MIA-Gen wurde auf Chromosom 19q13.32 (Köhler et al, 1996) und das murine Gen auf Chromosom 7 lokalisiert (Bosserhoff et al, 1997).

Die Expression von MIA-mRNA und Protein kann in fast allen Melanomen nachgewiesen werden. Melanozyten aus normaler Haut exprimieren im Gegensatz dazu kein MIA. Es lässt sich eine klar ansteigende Expression im Vergleich normaler Melanozyten, gutartiger Nävi und maligner Melanome beobachten. Das ergibt erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von MIA in der Tumورprogression. Neben Melanomen gibt es keine weitere neoplastische Erkrankung, bei der MIA durchgehend exprimiert wird. MIA-Expression lässt sich nur in wenigen, weit fortgeschrittenen Tumoren zeigen, wie zum Beispiel in vier von 25 Glioblastomen (Tab. 1.1)

In nicht neoplastischen Geweben konnte MIA in Knorpelzellen nachgewiesen werden. Ab Tag 10 der Mausembryogenese findet sich eine starke Expression in Rippen, Wirbelsäule, Gesicht und allen anderen Orten der Chondrogenese (Dietz et al., 1996). Für die Expression in anderen normalen Geweben gibt es bisher keinerlei Hinweise, so dass es sich bei der Expression von MIA um einen stark regulierten, für Melanome und Chondrozyten spezifischen Vorgang handelt.

Einleitung

Die Regulation der MIA-Expression wird durch ein 5'-seitig vom Gen gelegenes Fragment von 1386 Basen im humanen Promoter bzw. 1400 Basen im murinen Promoter vermittelt. Bis heute konnte der Promoter auf einen 40 bp langen Bereich (-210 bis -170 bp) eingengt werden, der in Melanomzellen die Expression eines Reportergens vermittelt und damit für die MIA-Expression in Melanomzellen wesentlich ist. Die mRNA-Transkriptions-Startstelle liegt -70 bp upstream des Translations-Start-Codons. Eine Computergestützte Analyse des Bereichs, der 5' zum MIA mRNA-Startpunkt liegt, ergab nur wenige bekannte Sequenzen die als mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in Betracht kommen. Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktor-Bindestellen SP-1, NF-κB und CTF/NF-1 sind 35, respektive 130 und 555 Basen aufwärts der mRNA-Startstelle lokalisiert. Es ist weder eine TATA-Box noch ein anderes cis-regulatorisches Element in der Sequenz zu finden. Durch CAT-Assays lassen den Schluss zu, dass das Fragment des MIA-Promotors von -493 bis -1 bezüglich den Startcodons notwendig und ausreichend ist, um ein hohes Niveau Zelltyp-spezifischer Genexpression zu vermitteln. Weiterhin wurde im murinen MIA-Pomotor ein weiteres cis-regulatorisches Element, MATF (melanoma associated transcription factor), an der Stelle von -210 bis -181 aufwärts des Transkriptionsstarts entdeckt, das die Transkription spezifisch in malignen, nicht aber in benignen Melanozyten aktiviert (Golob et al, 2001).

Tab. 1.1.: MIA Expressionsmuster

Gewebe	MIA-Expression (Positiv/Gesamt)
Haut	(2)/12
Nävi	9/15
Primäre Melanome	8/8
Metastasierte Melanome	14/14
Glioblastome	4/25
Kolonkarzinome	(1)/12
Mammakarzinome	2/9
Lungenkarzinome	0/6
Magenkarzinome	1/8
Nierenkarzinome	0/4

Einleitung

Basaliome

0/5

Schwache Expression ist durch Klammern angedeutet ().

Die erste beschriebene Funktion von MIA besteht in der Proliferationshemmung von Melanomzellen *in vitro*. Zugabe von MIA zu Melanomzellen in Kulturschalen führt zum Abrunden der Zellen. Auf nicht-melanozytäre Zellen wie Fibroblasten oder Keratinozyten wird dagegen keine Wirkung beobachtet. Durch detaillierte Analysen wurde gezeigt, dass MIA das Anheften der Melanomzellen beeinflusst. Durch Zugabe von MIA während der Phase des Anhaftens der Zellen kann die Interaktion zwischen der Zelloberfläche und Proteinen der ECM um bis zu 50% unterdrückt werden. Analysen zur Protein-Protein-Wechselwirkung zeigten, dass MIA spezifisch an Fibronectin und Laminin binden kann und dadurch auf diesen Matrixmolekülen die Bindungsstelle der Zelloberflächenmoleküle (Integrine) maskiert. Die Sekretion von MIA ermöglicht also den Melanomzyten das Ablösen von der umgebenden Matrix und kann so zu einer gesteigerten Motilität führen. Dadurch wird schließlich die Metastasierung begünstigt (Abb. 1.4).

In vivo deutet die starke Expression von MIA in Primärtumoren wie auch in Metastasen auf eine wichtige Funktion von MIA im Rahmen der Melanomentstehung hin. Durch stabile Transfektion mit Antisense-Konstrukten in Melanomzelllinien kann die Expression von MIA unterdrückt werden. Nach Injektion dieser Zellen in ihren syngeneten Wirt zeigt sich eine starke Reduktion hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Lungenmetastasen bilden zu können. Es bestätigt sich also die Funktion MIAs für den Vorgang der Metastasierung.

Ebenso scheint mit MIA ein Protein gefunden worden zu sein, das stark von Melanomzellen exprimiert und sezerniert wird. Es lag daher nahe, die Konzentration von MIA im Serum von Melanompatienten zu überprüfen. Die Auswertung der MIA-Spiegel im Serum gesunder Probanden ergab die Definition eines altersunabhängigen, oberen Normalwerts von 6,5 ng/ml. Die gemessenen Serumspiegel von Patienten mit metastasierenden malignen Melanomen der Stadien III und IV dagegen waren ausschließlich positiv. Bei Melanompatienten der Stadien I und II ließen sich in 13 bzw. 23% der Fälle erhöhte MIA-Serumwerte nachweisen. Leicht erhöhte Werte zeigten auch Patienten mit fortgeschrittenen Basaliomen auf lichtexponierter Haut. Bei Patienten mit benignen Nävi lagen nur in einem Fall schwach erhöhte Werte vor

Einleitung

(Tab 1.2). MIA zeigt sich also als Marker mit hoher Spezifität, was seine Wichtigkeit in der Diagnostik unterstreicht.

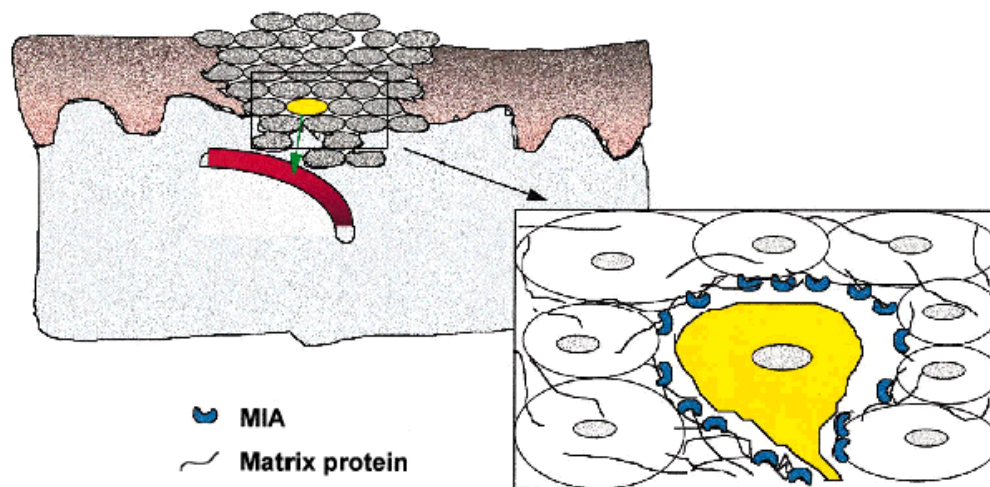


Abb 1.4: Schema der MIA-Funktion

MIA vermindert das Anheften der Melanomzellen an die umgebenden Matrixproteine und führt so zu einer erhöhten Motilität der Zellen. Diese können somit den Primärtumor verlassen und metastasieren. (Nach Bosserhoff et al.)

Einleitung

Tab. 1.2 MIA-Werte im Serum von Tumorpatienten und Kontrollpersonen

Patienten	n	Medianwert (ng/ml)	Positiv (%)
Gesunde Probanden	72	3,6	2 (2,7)
Sepsis	50	2,5	1 (2)
Melanom Stadium III/IV	50	18,8	50 (100)
Melanom Stadium I	38	4,4	5 (13)
Melanom Stadium II	13	5,5	3 (23)
Basaliom	25	4,2	4 (16)
Melanozytäre Nävi	10	3,8	1 (10)
Hirntumoren	23	2,6	0
Pankreas-Karzinom	34	5,3	6 (17)
Mamma-Karzinom	78	4,9	11 (14)
Sarkome	19	4,6	0

Im Rahmen der Versuche zur Charakterisierung und Funktion von MIA wurde in unserer Arbeitsgruppe ein noch unbekanntes Splice-Produkt auf mRNA-Ebene identifiziert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Protein MIA auf weitere Funktion und Regulation *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Weiterhin sollte das neu-entdeckte Peptid MIA_{splice} hinsichtlich Vorkommen, Funktion und Regulation charakterisiert werden.

Einleitung

2. Material & Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acrylamid	Fa. USB Art.-Nr. US75820
Agar, select	Fa. Sigma Art.-Nr. A-5054
Agarose	Fa. Life Technologies Art.-Nr. 540-5510UB
APS	Fa. BioRad Art.-Nr. 161-0700
Ampicillin	Fa. Sigma Art.-Nr. A-9518
Bis-Acrylamid	Fa. Sigma Art.-Nr. M 2022
Borsäure	Fa. Sigma Art.-Nr. B-7660
Bromphenolblau	Fa. Sigma Art.-Nr. B-5525
DAB	Fa. Sigma Art.-Nr.
Dextransulfat	Fa. Sigma Art.-Nr. D-8906
Dextrose	Fa. Sigma Art.-Nr. G-8270
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Sigma Art.-Nr. D-9779
DMEM	Fa. Biochrom Art.-Nr. FG 0415

Chemikalie	Bezugsquelle
DMEM/Ham's F12	Fa. Biochrom Art.-Nr. FG 4815
DMSO	Fa. Merck Art.-Nr. 2931
EDTA	Fa. Sigma Art.-Nr. E-5134
Ethanol, abs.	Fa. Merck Art.-Nr. 1.00983.2500
Ethidiumbromid	Fa. Sigma Art.-Nr. E-7637
FCS	Fa. Biochrom Art.-Nr. S 0115
Formamid	Fa. Sigma Art.-Nr. F-7503
Ficoll, Typ 400	Fa. Sigma Art.-Nr. F-4375
Glycerol	Fa. Sigma Art.-Nr. G-5516
Glycil-glycin	Fa. Sigma Art.-Nr. G-7278
Hering Sperma DNA	Fa. Sigma Art.-Nr. D-6898
H ₂ O ₂	Fa. Merck Art.Nr. 1.07210.0250
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fa. Merck Art-Nr. 5886
Maleinsäure	Fa. Merck Art-Nr. 800380
Maltose, 98%	Fa. Sigma Art-Nr. M-5895
β-Mercaptoethanol	Fa. Serva Art-Nr. 28625
MOPS	Fa. Sigma Art.-Nr. M-8899

Chemikalie	Bezugsquelle
Natriumchlorid, z. A:	Fa. Merck Art.-Nr. 1.06404.5000
NaOH-Plätzchen	Fa. Merck Art.-Nr. B828198
NiCl ₂	Fa. Merck Art.-Nr. 806722
Non-essential Amino Acids	Fa. Biochrom Art.-Nr. K 0293
Orange G	Fa. Chroma-Gesellschaft Art.-Nr. 1A 116
Poly-L-Ornithin	Fa. Sigma Art.-Nr. P2533
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Tween 20)	Fa. Sigma Art.-Nr. P-1379
Polyvinylpyrrolidon, 40.000	Fa. Sigma Art.-Nr. PVP-40T
Rubidiumchlorid	Fa. Sigma Art.-Nr. R-2252
Salzsäure, 1N	Fa. Merck Art.-Nr. 9057.1000
Select Yeast Extract	Fa. Sigma Art.-Nr. Y-0875
Tetracyclin	Fa. Sigma Art.-Nr. T-3383
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Fa. Merck Art.-Nr. 1.06448.5000
Tris Base	Fa. Sigma Art.-Nr. T-1503
Tris Hydrochlorid	Fa. Sigma Art.-Nr. T-3253
Triton X-100	Fa. Sigma Art.-Nr. X-100
Trypton	Fa. Sigma Art.-Nr. T-9410

Chemikalie	Bezugsquelle
Trypsin/EDTA	Fa. PAA Art.-Nr. L11-004
Tween 20	Fa. ICN Art.-Nr. 194841
Xylen Cyanol FF	Fa. Sigma Art.-Nr. X-4126

1.2. Lösungen und Puffer

Acrylamid (6% Stammlösung)

Acrylamid	28,5 g
N-N'-Methylenbisacrylamid	1,5 g
Harnstoff	210 g
TBE (10-fach)	50 ml
H ₂ O	ad 0,5 l

Anodenpuffer A

Methanol	100 ml
Tris 1 M, pH 10,4	12,5 ml
H ₂ O	ad 0,5 l

Anodenpuffer B

Methanol	100 ml
Tris 1 M, pH 10,4	150 ml
H ₂ O	ad 0,5 l

APS (10%)

NH ₄ -Persulfat	10 g
H ₂ O	ad 100 ml

Blockierungslösung für DIG-Detektion (10x Stammlösung)

Blockierungsreagenz	10%
Maleinsäure	ad 1 l

Blockierungslösung für Immunfärbung

BSA	2 g
TBST	ad 100 ml

CIA

Chloroform:Isoamylalkohol	24:1 (v/v)
---------------------------	------------

DAB-Färbelösung

TBS	40 ml
DAB (20 mg/ml)	500 µl
H ₂ O ₂ (30%)	12 µl
NiCl ₂ (8%)	200 µl

Denhardt`s Lösung (50-fach)

Ficoll	1 g
Polyvinylpyrrolidon	1 g
Rinderserumalbumin	1 g
H ₂ O	100 ml

Detektionspuffer

Tris-HCL	100 mM
NaCl	150 mM
	ad pH 9,5

Detergenzlösung

10% Brij 58	40 ml
Na-Desoxycholat	1,6 g
0,5M EDTA, pH 8,0	52 ml
2M Tris-HCl, pH 8,0	10 ml
H ₂ O	298 ml

Fixierungslösung für immunhistochemische Färbungen

PBS	45 ml
Formaldehyd, 37%	5,4 ml

Gelauftragspuffer (10-fach)

Glycerin	50%
EDTA, pH 8,0	10 mM
Bromphenolblau	0,2%
Xylencyanol	0,2%

Hybridisierungslösung

Natriumchlorid	1 M
Formamid	50%
Heringssperma DNA	0,8 mg/ml
PHS	1-fach
Dextransulfatlösung	10%

Kathodenpuffer

Tris 1 M, pH 9,4	12,5 ml
D,L-Norleucin	2,63 g
H ₂ O	ad 500 ml

Laemmli-Probenpuffer

Tris 1 M, pH 6,8	1,25 ml
Glycerin	0,7 ml
SDS, 20%	1 ml
Bromphenolblau	2,5 mg
β-Mercaptoethanol (fakultativ)	0,5 ml
H ₂ O	ad 10 ml

Laemmli-Laufpuffer (5-fach)

Tris-Base	15,1 g
Glycin	94 g
SDS, 10%	50 ml
H ₂ O	ad 1 l

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM
NaOH, fest	ad pH 7,5

MOPS (10-fach)

MOPS, pH 7,0	40 mM
Na-Acetat	10 mM
EDTA, pH 8,0	5 mM

Phenol

eingefrorenes Phenol wurde bei 65°C geschmolzen,
anschließend mit 1M Tris-HCl pH 8,0 ausgeschüttelt
und mit TE 10.1 überschichtet.

Phenol/CIA

Phenol:CIA	1:1 (v/v)
------------	-----------

Puffer P1 (Resuspensionspuffer, Fa. QIAGEN®)

Tris-HCl (pH8,0)	6,06 g
EDTA	3,72 g
Rnase	100 mg
H ₂ O	ad 1 l

Puffer P2 (Lysis-Puffer, Fa. QIAGEN[®])

NaOH	8 g
SDS (20%)	50 ml
H ₂ O	ad 1 l

Puffer P3 (Neutralisationspuffer, Fa. QIAGEN[®])

KOAc	294,5 g
H ₂ O	ad 1 l
	ad pH 5,5

Puffer PB (Fa. QIAGEN[®]) siehe Vogelstein und Gillespie; 1979

Puffer PE (Fa. QIAGEN[®]) siehe Vogelstein und Gillespie; 1979

Puffer RLT (Fa. QIAGEN[®]) Boom et al; 1990,

Puffer RPE (Fa. QIAGEN[®]) Boom et al; 1990,

Puffer RW1 (Fa. QIAGEN[®]) Boom et al; 1990,

Puffer N3 (Fa. QIAGEN[®]) siehe Vogelstein und Gillespie; 1979

Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer, Fa. QIAGEN[®])

NaCl	43,83 g
MOPS	10,46 g
	ad pH 7,0
EtOH	150 ml
H ₂ O	ad 1 l

Puffer QC (Waschpuffer, Fa. QIAGEN[®])

NaCl	58,44 g
MOPS	10,46 g
	ad pH 7,0
EtOH	150 ml
H ₂ O	ad 1 l

Puffer QF (Fa. QIAGEN[®])

NaCl	73,05 g
Tris-Base	6,06 g
	ad pH 8,5
EtOH	150 ml
H ₂ O	ad 1 l

RNA-Auftragspuffer

RNA-Laufpuffer	1-fach
Formaldehyd	6%
Formamid	45%
Glycerin	5%
Bromphenolblau	0,0125%
Xylenyanol	0,0125%

RNA-Laufpuffer

	Morpholinipropionsäure	200 mM
	Natriumacetat	80 mM
	EDTA, pH 8,0	10 mM
SM		
	Tris-HCl (1M pH 7,5)	50 ml
	NaCl	5,8 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2g
	Gelantine (2%ig)	5 ml
	H ₂ O	ad 1 l
SSC (20-fach)		
	NaCl	175,3 g
	Na-Citrat	88,2 g
	H ₂ O	ad 1 l
		ad pH 7,0
SSPE (20-fach)		
	NaCl	174,0 g
	NaH ₂ OPO ₄ ·H ₂ O	27,6 g
	EDTA	7,4 g
		ad pH 7,4
TBE (10-fach)		
	Tris Base	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA (0,5M, pH 8,0)	40 ml
	H ₂ O	ad 1 l
TBST (10-fach)		

	Tris-Base	15,8 g
	NaCl	87,7 g
	Tween 20	5 ml
	H ₂ O	ad 1 l
		ad pH 8
TE 10.1		
	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM
TE 10.01		
	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA, pH 8,0	0,1 mM
TBF I (Transformationspuffer)		
	MOPS, pH 7,0	10 mM
	RbCl	10 mM
TBF II (Transformationspuffer)		
	MOPS, pH 6,5	100 mM
	CaCl ₂	50 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15%

Waschpuffer zur DIG-Detektion

Maleinsäure,	100 mM
NaCl	150 mM
1N NaOH	ad pH 7,5
Tween 20	0,3%

1.3. Medien zur Bakterienanzucht

LB₀ (Lennox, 1955)

	Bacto Tryptone	10 g
	Bacto Yeast Extract	5 g
	NaCl	10 g
	1N NaOH	ad pH 7,5
	H ₂ O	ad 1 l
2x Yeast Tryptone (2xYT)		

Bacto Tryptone	16 g
Bacto Yeast Extract	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l

Selektivmedium (LB/Amp)

Lbo	500 ml
Ampicillin (50 mg/ml)	500 µl/ml

Selektivmedium (LB/Tet)

Lbo	500 ml
Tetracyclin (12 mg/ml)	500 µl/ml

Transformationsplatten (YT-Ap-X-Gal-IPTG-Platten)

Bacto Tryptone	8 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Ampicillin	50 mg
X-Gal	40 mg
IPTG (100mM)	375 µl
Bacto Agar	15 g
H ₂ O	ad 1 l

LBo-Platten

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
MgSO ₄ (1 M)	10 ml
1N NaOH	ad pH 7,5
Bacto Agar	13 g
H ₂ O	ad 1 l

DMEM + 10% FCS

DMEM	500 ml
FCS	50 ml
Vitamine	5 ml (100 mM)
nichtessentielle AS	5 ml

Einfriermedium

Kulturmedium	5 ml
FCS	4 ml
DMSO	1 ml

1.4. Verwendete Molekularbiologische Systeme

DIG-High Prime DNA Labeling And Detection Starter Kit	Fa. Roche Diagnostics Art.-Nr. 1 745 832
--	---

QIAEX II Gel-Extraction-Kit	Fa. QIAGEN® Art.-Nr. 20021
-----------------------------	-------------------------------

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Fa. QIAGEN® Art.Nr. 27104
--------------------------------------	------------------------------

QIAquick PCR Purification Kit	Fa. QIAGEN® Art.-Nr. 28104
----------------------------------	-------------------------------

PCR-Script® Cam Cloning Kit	Fa. Stratagene Art.-Nr. 211192
-----------------------------	-----------------------------------

RNeasy Mini Kit	Fa. QIAGEN® Art.Nr. 74104
-----------------	------------------------------

Taq PCR Master Mix Kit	Fa. QIAGEN®
------------------------	-------------

Art.Nr. 201443

Vectastain[®] *Elite*[®] ABC Kit

Fa. Vector Laboratories, Inc

Art.-Nr. PK 6100

1.5. Verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	Schnittstelle	Bezugsquelle
Bam HI	5'-G↓GATC C-3' 3'-C CTAG↑G-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15201-023
Bgl II	5'-A↓GATC T-3' 3'-T CTAG↑A-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15213-010
Eco RI	5'-G↓AATT C-3' 3'-C TTAA↑G-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15202-013
Hind III	5'-A↓AGCT T-3' 3'-T TCGA↑A-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15207-012
Kpn I	5'-G↓GTAC G-3' 3'-A CATG↑C-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15232-010
Mlu I	5'-A↓CGCG T-3' 3'-T GCGC↑A-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15432-016
Srf I	5'-GCCC↓GGGC-3' 3'-CGGG↑CCCG-5'	Fa. Stratagene Art.-Nr. 501064
Sst I	5'-G AGCT↓C-3' 3'-C↑TCGA G-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15222-011
Xba I	5'-T↓CTAG A-3' 3'-A GATC↑T-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15226-014

<u>Enzym</u>	<u>Schnittstelle</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Xho I	5'-C↓TCGA G-3' 3'-G AGCT↑C-5'	Fa. Gibco Art.-Nr. 15231-012

1.6. Modifizierende Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Bezugsquelle</u>
T4-DNA-Ligase	Fa. Roche Diagnostics Art.-Nr. 481 220
Pfu-DNA-Ligase	Fa. Stratagene Art.-Nr. 600320
Bakterielle Alkalische Phosphatase	Fa. Roche Diagnostics Art.-Nr. 713 023

1.7. Bakterienstämme und Plasmide

<u>Stamm</u>	<u>Herkunft/Referenz</u>
Epicurian Coli [®] XL I Blue	Fa. Stratagene Art.-Nr. 200130
<u>Plasmide</u>	<u>Herkunft/Referenz</u>
pPCR - Script [™] Cam SK(+)	Fa. Stratagene Art.-Nr. 211192
pQE 40	Fa. QIAGEN [®] Art.-Nr. 32915

1.8. Zelllinien

Bis auf eine Ausnahme stammen die verwendeten Zelllinien aus der Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg.

Die Melanomzelllinie CRL-1424 wurde erworben von der Firma ATCC, in Manassas, Virginia, USA.

1.9. Längenmarker

DNA-Längenmarker

DNA Molecular Weight Marker VII	Fragmentgrößen: 19, 26, 34, 34, 37, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, Art.-Nr. 1336045 489, 501, 692, 900, 1114 bp	Fa. Roche Diagnostics
DNA Molecular Weight Marker III	Fragmentgrößen: 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp	Fa. Roche Diagnostics Art.-Nr. 528552
Lambda DNA/ <i>Eco</i> 471 (<i>Ava</i> II) Marker, 13	Fragmentgrößen: 23, 29, 32, 42, 45, 67, 73, 88, Art.-Nr. SM 1051 151, 215, 242, 272, 308, 310, 345, 398, 433, 5, 11, 513, 590, 597, 894, 974, 985, 1284, 1420, 1611, 1951, 2005, 2134, 2555, 2606, 3676, 6442, 6555, 8126 bp	Fa. MBI Fermentas

RNA-Längenmarker

RNA Molecular Weight Marker I	Fragmentgrößen: 310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 bp	Fa. Roche Diagnostics Art.-Nr. 11062611001
-------------------------------	--	---

Protein-Marker

Kaleidoscope Prestained Standards, broad range	Fa. Bio-Rad Art.-Nr. 161-0324
---	----------------------------------

<u>Protein</u>	<u>Farbe</u>	<u>Grösse (Da)</u>
Myosin	Blau	202,000
Beta-galactosidase	Magenta	133,000

BSA	Grün	71,000
Carbonic anhydrase	Violett	41,800
Soybean trypsin inhibitor	Orange	30,600
Lysozyme	Rot	17,800
Aprotinin	Blau	6,900

2. Methoden

2.1. Kultivierung von Bakterien

2.1.1. Anzucht von Bakterien

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden in einem temperaturkonstanten Brutraum bei 37°C inkubiert. Von Einzelkolonien ausgehend, wurden 5 ml Flüssigkulturen bei 37°C gerollert; Volumina bis 500 ml wurden ebenfalls im temperierten (37°C) Brutraum angezogen. Das Bakterienwachstum wurde photometrisch über die Zunahme der Absorption bei 600 nm gemessen: eine OD₆₀₀ Einheit entspricht einer Bakteriendichte von 10⁸ pro ml (Sambrook et al., 1989). Als Komplexmedien dienten 2xYT bzw. LB₀ (2.3.). Für das *blue-white-screening* von pUC Plasmid-Derivaten (Vieira und Messing, 1982) wurden Transformationplatten (2.3.) benutzt.

2.1.2. Gewinnung von kompetenten Bakterien

Nach der Methode von Hanahan (1983) wurde aus einer Einzelkolonie ausgehend eine 5 ml Übernachtskultur in LB mit Tetracyclin (12,5 µg/ml) angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 250 ml LB/Tetracyclin angeimpft und im Schüttler bei 37° C inkubiert bis die Bakteriendichte eine OD₆₀₀ von 0,45 - 0,55 erreicht hatte. Das Volumen wurde dann auf vier sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt, durch Zentrifugation bei 2500 upm 10 min pelletiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurden die Pellets in jeweils 4 ml vorgekühltem TBF I resuspendiert und, in einem Röhrchen vereinigt, 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2500 upm, 10 min) wurde das Pellet in 2 ml TBF II aufgenommen, vorsichtig geschüttelt und auf Eis zu Aliquots mit je 50 µl abgefüllt, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80c aufbewahrt.

2.2. Kultivierung von humanen Zellen

2.2.1. Anzucht von Zellen

Zum Aussäen von Zellen wurde die Zellsuspension im Wasserbad (2 min) aufgetaut, in 9 ml Medium aufgenommen und die Zellen abzentrifugiert (250 g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit Belüftungskappe (Fa. Costar) überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im befeuchteten Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Die weitere Anzucht von Zellen erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit und benötigter Zellmenge in 75 cm² bzw. 162 cm² Zellkulturflaschen (Fa. Costar) mit 10 ml bzw. 25 ml Medium. In der Wachstumsphase wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt. Am Tag nach der Teilung einer Kultur bzw. nach dem Aussäen erfolgte ebenfalls ein Wechsel des Mediums.

2.2.2. Kulturteilung

Zum Splitten einer Kultur wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 3 ml bzw. 5 ml (75 cm² oder 162 cm² Kulturflaschen) PBS gewaschen. Dem Zellrasen wurden 3 ml (5 ml) Trypsin/EDTA zugegeben und der Ansatz im Brutschrank inkubiert (5 min, 37°C). Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml bzw. 7 ml Medium aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen (Fa. Falcon) überführt und abzentrifugiert (250 g, 5 min). Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und nach Bedarf aufgeteilt.

2.2.3. Einfrieren von Zellen

Zur Lagerung von Zellen wurden die abzentrifugierten Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Cryoröhrchen überführt (1 ml Zellsuspension/Röhrchen). Die Zellen wurden in einem Einfrierbehälter (Cryo Freezing Container, Fa. Nalgene) durch langsames Abkühlen (1°C/min) auf –80°C vorgefroren und anschliessend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Das Auszählen von Zellen erfolgte je nach benötigter Genauigkeit in einer Neubauer Zählkammer oder im Coulter Zähler (Coulter Z1, particle counter, Fa. Coulter).

Zur Ermittlung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer werden 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau gemischt und in die Kammer überführt. Die Zellzahl ergab sich durch folgende Formel:

$$\begin{aligned} & \text{Mittelwert der gezählten Zellen in den jeweiligen Quadranten} \\ & \times 5 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \\ & \times 10^4 \text{ (Volumenfaktor: } 0,1 \text{ mm}^2 \text{ ausgezähltes Volumen)} \end{aligned}$$

Für das Auszählen im Coulter Counter wurden 25 µl der Zellsuspension in einem Zählbecher mit 10 ml Isoton verdünnt und gezählt. Die Zellzahl ergab sich aus:

$$\begin{aligned} & \text{Mittelwert aus mehreren Messungen} \\ & \times 400 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \\ & \times 2 \text{ (Volumenfaktor: } 500 \text{ µl ausgezähltes Volumen/Messung)} \end{aligned}$$

2.3. Präparation von Nukleinsäuren

2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen wurden verschiedene Methoden angewandt, je nach angestrebter Ausbeute und Reinheitsgrad.

2.3.1.1. Minipräparation aus 5 ml Kulturen

Die Plasmid-Extraktion nach dem Minipräparations-Protokoll der Fa. QIAGEN® beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983) unter Bindung der DNA an eine Silicamatrix unter Hochsalzbedingungen.

Die sedimentierten Bakterien wurden in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt. Zur Lysierung der Zellen wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer N3 und erneutem vorsichtigen Vermengen wurde der gebildete Niederschlag durch Zentrifugation (15000 upm, 10 min) pelletiert. Der Überstand wurde auf Zentrifugensäulen übertragen, die Plasmid-DNA durch nochmaliges zentrifugieren (15000 upm, 1 min) an die Säule gebunden. Nach zwei Waschschritten (je 750 µl, Puffer PE) wurde die DNA mit 50 µl TE 10.01 eluiert. Die Konzentration der extrahierten DNA betrug ca. 500 - 1000 µg/ml.

2.3.2. RNA-Extraktion aus Zellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits (Fa. QIAGEN®) nach einer modifizierten Methode nach Boom (Boom et al; 1990) durchgeführt. Die humanen Tumorzellen wurden in einem Guanidin-Isothiocyanat enthaltendem Puffer aufgebrochen und homogenisiert. Dem Lysat wurde Ethanol zugefügt, um so die selektive Bindung der RNA an die Rneasy Silica-Gel-Membran zu erleichtern. Nach Beschicken der Minisäule mit dem Lysat bindet die Gesamt-RNA an die Membran, Kontaminationen werden ausgewaschen und reine Gesamt-RNA wird eluiert.

Die humanen Tumor-Zellen wurden direkt in der Kulturschale lysiert. Dazu wurde die Zellzahl bestimmt, das Kulturmedium vollständig abgesaugt und 600 µl RLT Puffer zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt. Das Zelllysate wurde kurz gevortext, um zu vermeiden dass Zellklumpen im Lysat zurückbleiben. Um die Probe zu homogenisieren, wurde das Lysat mehrmals durch eine 0,9 mm Nadel (Fa. Becton Dickinson), verbunden mit einer sterilen, RNase-freien Spritze (Fa. Becton Dickinson), gezogen. Nach Zugabe von 600 µl Ethanol und Vermengen der Probe durch mehrmaliges Pipetieren wird diese auf die Rneasy-Säule aufgebracht. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (13000 upm, 15 sec, Eppendorff Zentrifuge) zur Bindung der Gesamt-RNA an die Silica-Gel-Matrix der RNeasy-Säule, die gebundene RNA wird einmal mit Puffer RW1 (700 µl, 13000 upm, 15 sec, Eppendorff Zentrifuge) und zweimal mit Puffer RPE (500 µl, 13000 upm, 15 sec bzw. 2 min, Eppendorff Zentrifuge) gewaschen. Um die eventuelle Pufferrückstände zu eliminieren wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (13000 upm, 1 min, Eppendorff Zentrifuge) und dann die Gesamt-RNA wurde mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert (13000 upm, 1 min, Eppendorff Zentrifuge). Die erhaltenen RNA-Lösungen wurden bei -80° C aufbewahrt.

2.3.3. DNA-Reinigung von PCR-Produkten oder nach Enzymbehandlung

Die DNA-Abtrennung von Primern, Nukleotiden und Enzymen wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Fa. QIAGEN®) durchgeführt. Er beruht auf demselben Prinzip wie der bereits beschriebene QIAprep Spin Plasmid Kit (2.2.1.1., Fa. QIAGEN®).

Nach Angaben des Herstellers wurde die Lösung mit dem gewünschten Fragment mit dem 5fachen Volumen des Puffers N 3 vermischt, auf eine QIAquick-Säule aufgebracht

und 1 min bei 15000 upm zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit je 500 µl Puffer PE gewaschen und danach die DNA mit 50 µl TE 10.1 Puffer eluiert.

2.3.4. DNA-Reinigung aus Agarosegelen

Das Gel-Extraktionsprotokoll für DNA der Fa. QIAGEN® beruht auf der Löslichkeit von Agarose und der selektiven Bindung von Nucleinsäuren an eine Silicagel-Matrix unter Hochsalzbedingungen (Vogelstein und Gillespie, 1979).

Das Gelstück mit der gewünschten DNA wurde mit einem Skalpell möglichst klein ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zunächst wurde das Volumen des Gelstückchens bestimmt und pro 100 mg Gel 300µl des Puffers QX 1 zugegeben. Danach wurden 10 µl der Silicagel-Matrix QIAEX II hinzugefügt und 10 min bei 50° C inkubiert, wobei die Suspension alle 2 min gevortext wurde, um eine maximale Bindung der DNA zu gewährleisten. Nach Zentrifugation (15000 upm, 1 min) folgte ein Waschschritt mit 500 µl Puffer QX 1 zur Entfernung von Agaroseresten und zwei weitere mit Puffer PE zur Entsalzung der DNA. Nach Trocknung des Pellets wurde die DNA mit 2 x 20 µl TE 10.01 eluiert.

2.4. Restriktionsspaltung von DNA

Die analytische Spaltung von DNA wurde 1-4 h in 10-100 µl Ansätzen durchgeführt, die jeweils 0,1-2 µg DNA, 3 bis 10 (bei großer DNA-Menge) Einheiten Restriktionsenzym sowie 1/10 des Endvolumens 10 x Restriktionspuffer enthielten. Die Zusammensetzung des Puffers und die Inkubationstemperatur richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Für präperative Ansätze wurden DNA-Mengen bis 20 µg und entsprechend erhöhte Enzymmengen (max. 20 Einheiten) eingesetzt.

2.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.5.1. Agarosegele

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich zwischen 20 und 0,2 kb wurden Gele verwendet, die 0,7-1,6% Agarose und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE-Puffer enthielten. Die Agarose wurde im Mikrowellenherd gelöst und in eine Gelgießschale mit darüberhängendem Kamm gegossen. Die Geldicke betrug unter diesen Bedingungen etwa 5 mm, die Geldaschen faßten je nach Kammgröße 15 - 50 µl DNA-Lösung. Für die Elektrophorese wurde die DNA mit 1/10 Volumen 10x

Gelauftragungspuffer gemischt. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TBE mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid. Die Elektrophorese dauerte je nach gewählter Stromstärke (20 - 100 mA) sowie Gel- und Kammergröße zwischen 1 und 10 h. Die DNA-Fragmente im Gel wurden anschließend auf einem UV-Leuchtschirm (Fa. Vilber Lourmat) sichtbar gemacht und auf einem Wechseldatenträger (Fa. Sony) gespeichert.

2.5.2. RNA-Gele

Nach der von Lehrach et al. (1977), Seed (1982a) und Goldberg (1990) beschriebenen Methode wurde die Gelelektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. So wird der Bildung möglicher Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA vorgebeugt.

Für die Elektrophorese wurden 20 µg Gesamt-RNA verwendet. Das entsprechende Volumen der RNA-Lösung wurde unter Vakuum lyophilisiert (Speed mVac Typ Alpha RVC, Fa. Christ), in 20 µl RNA-Auftragungspuffer resuspendiert, bei 65° C 10 min denaturiert und schließlich sofort auf Eis gestellt um die erneute Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die so behandelte RNA wurde auf ein denaturierendes Agarosegel (1% Agarose, 1 x RNA-Laufpuffer, 2,2 M Formaldehyd, 0,3 µg/ml Ethidiumbromid) aufgebracht. Für das Gel wurden je nach Gelgröße die entsprechenden Mengen Agarose in Wasser und 10 x RNA-Laufpuffer durch Kochen in einem Mikrowellenherd gelöst, nach Abkühlung auf ca. 50° C durch Zugabe von 37% Formaldehyd und 10mg/ml Ethidiumbromid fertig gemischt und in eine Gelgießschale mit darüberhängendem Kamm gegossen. Die Elektrophorese wurde bei 60 mA in 1 x RNA-Laufpuffer durchgeführt, danach 30 min in Wasser geschwenkt und wie unter 2.4.1. beschrieben photographiert. Das Vorhandensein der ribosomalen RNA-Banden dokumentierte die Integrität der RNA.

2.6. Gelelektrophorese von Proteinen

2.6.1 SDS-Page-Gele

Nach einer Methode von Maizel (1966) wurden Proteine mit Hilfe von SDS-Page-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe von SDS zur Polyacrylamid-Matrix wurden die Proteine vollständig entfaltet und somit einer Auftrennung zugänglich gemacht.

Zur Herstellung eines 12%igen Trenngels wurden 6,2 ml Acrylamid-Stammlösung (29:1) mit 5,6 ml Wasser, 3 ml Tris-HCl-Lösung (1,875 M, pH 8,8), 150µl SDS-Lösung

(10%) vermennt. Nach Zugabe von 7,5 µl Temed und 50 µl frisch hergestellter Ammoniumpersulfat-Lösung (APS, 10%) wurde die Lösung sofort in eine Gelgiessapparatur (Fa. BioRad) gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das denaturierte Zelllysate (3 min, 95° C, Eis) mit Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Es wurde Laempuffer nach Laemmli verwendet, nach Anlegen der Spannung wurden die Proteine grössenabhängig aufgetrennt. Die erhaltenen Gele wurden entweder Coomassie-gefärbt oder in Western-Blot Analysen weiterverwendet.

2.7. Klonierung und Transformation

2.7.1. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase

Die Abspaltung der 5'-endständigen Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten, zur Vermeidung der intramolekularen Selbstligierung, wurde mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 Einheit pro µg DNA) nach der Vorschrift von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.7.2. Ligieren von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente für Ligierungen wurden, wenn erforderlich, mit alkalischer Phosphatase behandelt und nach einer präparativen Gelelektrophorese aus dem Agarosegel isoliert. Zur Ligierung wurden 0,1-1,0 µg der entsprechenden DNA-Fragmente mit jeweils einer Einheit T4-DNA-Ligase sowie 1/10 des Endvolumens 10 x Ligasepuffer, meist in 20 µl-Ansätzen, inkubiert. Die Inkubation wurde alternativ 1-2 h bei 37°C, ÜN bei 4°C oder 2-3 h bei RT durchgeführt.

2.7.3. Transformation von *E.coli*

Zur Transformation wurden 50 µl kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz gemischt und 10 min im Eisbad inkubiert. Es wurden 15 ml Reaktionsröhrchen (Falcon 2059 Polypropylene Tubes, Fa. Becton Dickinson) verwendet, die für den folgenden Wärmeschritt optimiert sind. Nach dem Wärmeschritt (42° C, 45 sec) und einer weiteren Inkubation (2 min) im Eisbad wurde der Ansatz mit 300 µl LB₀ verdünnt, 45 min bei 37° C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert und anschließend auf Selektivmedium ausplattiert.

2.8. Northern-Blotting

Die Übertragung gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA-Fragmente auf positiv geladene Membranen (Gene Screen Plus[®], Du Pont NEN[®]) wurde mittels Kapillarblot durchgeführt (Sambrock et al., 1989). Das RNA-Gel wurde zuerst in 20 x SSC gewaschen, um das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen. Auf einer Unterlage aus drei Lagen 3 MM Chromatographiepapier (Fa. Whatman), getränkt in 10 x SSC, wurden das Gel und darauf die Nylonmembran plaziert, mit weiteren drei Lagen 3MM Chromatographiepapier bedeckt und mit einem Stapel saugfähigen Zellstoff überschichtet. Nach Beschweren des Aufbaus erfolgte das Blotten über Nacht. Als Transfer-Puffer diente 10 x SSC. Die Immobilisierung der DNA wurde entweder durch Inkubation (2h, 80°C) der trockenen Membranen oder durch *UV-crosslinking* (Stratalinker 1800, Fa. Stratagene) erreicht.

2.9. Markierung von DNA durch *random priming*

DIG-Markierungen von DNA mit statistischen Hexanukleotiden als unspezifischen Primern (*random priming*) und DIG-dUTP wurden nach der Vorschrift von Feinberg und Vogelstein (1984), modifiziert nach Empfehlungen der Firma Roche Diagnostics (DIG Random Primed DNA-Labeling Kit) durchgeführt. Bei 95°C (10 min) denaturierte DNA (0,1-1,0 µg) wurde mit 4 µl DIG-High Prime versetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Um die Menge der markierten Sonde zu ermitteln wurde je 1 µl einer Verdünnungsreihe der gelabelten Sonde auf eine Nylonmembran aufgebracht und direkt durch Chemilumineszenz detektiert.

2.10. Hybridisierung

2.10.1. Benutzte Gensonde

Als Sonden zum Nachweis exprimierter RNA dienten PCR-generierte Fragmente der Peptide MIA und MIA_{splice}.

2.10.2. Vorhybridisierung

Um unspezifische Bindung der DIG-markierten DNA-Sonde an Matrizen-DNA zu vermeiden, wurden die Membranen mit immobilisierter RNA aus Northern-Transfer 30 min in Hybridisierungslösung bei 68° C vorinkubiert.

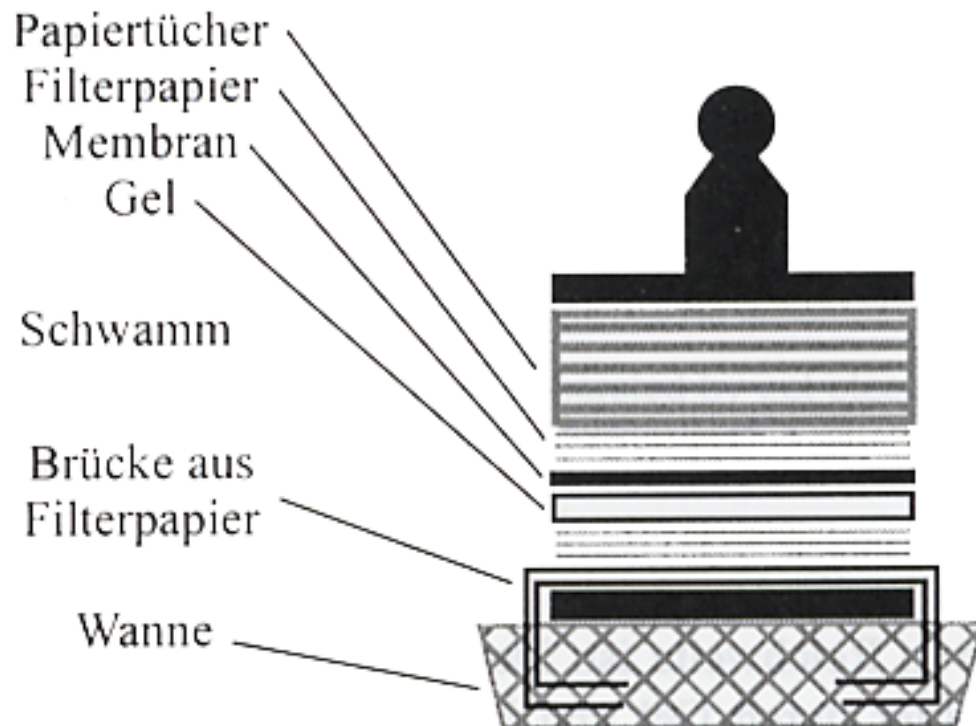


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau eines Blots

2.10.3. Hybridisierung

Dem Vorhybridisierungsansatz wurde die denaturierte (5 min, 95°C; 5 min, 0°C) DIG markierte DNA-Sonde zu einer Endkonzentration von 50 - 100 ng/ml zugesetzt und mindestens 6 h bei der Hybridisierungstempertatur von 68° C in einem Hybridisierungssofen (Minihybridisierungssofen OV 1, Fa. Biometra) inkubiert. In dieser Zeit fand die Hybridisierung der markierten DNA-Sonde mit den homologen RNA-Sequenzen statt.

2.10.4. Waschen der hybridisierten Membranen

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst zweimal 5 min bei RT 2 x SSC, 0,1% SDS unter leichtem Bewegen gewaschen. Die Stringenz wurde durch einen weiteren Waschschrift mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS und Erhöhung der Waschtemperatur auf 68° C verstärkt. Die hybridisierten Membranen wurden direkt zur Chemilumineszenz-Detektion eingesetzt.

2.11. Detektion

Die mit der DNA-Sonde hybridisierte RNA wurde durch Chemilumineszenz detektiert. CSPD (Disodium 3-(4-methoxy-spiro {1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphate; C₁₈H₂₀ClO₇PNa₂; Abb. 3.5.) ist ein Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase und ermöglicht eine ausserordentlich rasche und sensitive Detektion von Biomolekülen durch extrem schnelle Produktion von sichtbarem Licht, welches mit Röntgenfilmen detektiert wird. Die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD führt zur Bildung eines meta-stabilen Dioxetan Phenolat-Anion, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht bei 477 nm emittiert. Nach der Hybridisierung des RNA-Blots und folgenden stringenten Waschschriften wurde die Membran 5 min unter Schütteln in Waschpuffer gewaschen, um eventuell verbliebene ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschliessend wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Blockierungspuffer blockiert (30 min, RT). Die Bindung der Antikörper an die DIG-markierte Probe erfolgte durch 30 minütige Inkubation in 20 ml Antikörperlösung (1:10000), gefolgt von zweimaligem Waschen (15 min, Schütteln). Die Membran wurde ca. 5 min in Detektionslösung

equilibriert und anschliessend in 1 ml CSPD Arbeitslösung inkubiert (RT, Schütteln). Nach der Bindung des Substrats an den Antikörper wird die überschüssige CSPD-Lösung abgenommen, die Membran fest in einem Hybridisierungsbeutel verschlossen und zur Verstärkung der Lumineszenz-Reaktion 10 min bei 37°C inkubiert. Der Blot wurde ÜN bei RT auf einen Röntgenfilm exponiert (Kodak, X-Omat).

2.12. Synthese von Oligonukleotiden

Synthetische Oligonukleotide wurden bei der Fa. MWG Biotech bezogen. Die bereits gereinigten Oligonukleotide wurden lyophilisiert geliefert, nach Erhalt in Wasser resuspendiert und bei -20° C aufbewahrt.

2.13. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der gereinigten Plasmid-DNA wurde durch das Labor SequiServe, Vaterstetten durchgeführt.

2.14. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.14.1. Amplifizierung von MIA und MIA_{splice}

Ausgehend von der bekannten Sequenz der Proteins MIA und der Splice-Stelle des Peptids MIA_{splice} wurden spezifische Fragmente der beiden Templates durch PCR amplifiziert. Zu diesem Zweck wurden in ein dünnwandiges 0,5 ml Reaktionsgefäß (Fa. Biozym Diagnostic GmbH) ein Gemisch aus 1 ng Template-DNA, 25 µl Taq PCR Master Mix (Fa. Qiagen) je 100 pM sense bzw. antisense Primer und 22 µl H₂O einer Polymerasekettenreaktion unterzogen. Die Primer wurden so hergestellt, daß sie an den Enden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthielten, um so die Effizienz der Klonierung zu erhöhen. Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt: Zunächst eine Denaturierung bei 94° C für 1 min, gefolgt von 30 Zyklen mit 45 sec Denaturierung (92° C), 45 sec Annealing (59° C) und 1 min Elongation (72° C). Nach erfolgter PCR wurden die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt und gereinigt.

2.14.2. cDNA-Screening mittels PCR

Mit Hilfe der Methode der Polymerase Kettenreaktion wurden unterschiedliche humane cDNA's auf Expression des Proteins MIA und dessen Spliceprodukts MIA_{splice} untersucht.

Die Bedingungen waren identisch zu 2.12.1., die gewählten Primer enthielten jedoch keine Restriktionsschnittstellen, da die erhaltenen PCR-Produkte nur über ein Agarosegel visualisiert und dann bei -20°C aufbewahrt wurden.

2.15. Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA

Die Nukleinsäure-Konzentration von DNA und RNA wurde mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Photometer (UV/VIS Spektrometer Lambda, Fa. Perkin Elmer) bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Zusätzlich wurde der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gebildet, als Maß für die Reinheit der Lösung, der im Idealfall 2 beträgt.

2.16. Western Blotting

Um Proteine sichtbar zu machen oder um gezielt nach einem bestimmten Protein zu suchen bediente man sich der Methode des Western Blots (Khyse-Andersen, 1984)). Diese Transferart weist ein diskontinuierliches Puffersystem auf und ermöglicht eine maximalen Übertrag der Proteine, der zudem, als Folge eines sehr homogenen elektrischen Feldes zwischen den beiden Elektroden, sehr gleichmässig ist.

Vor der Anwendung wurden die Graphitelektroden mit Ethanol (70%) und H₂O gereinigt. Nachdem eine Nitrocellulose-Membran (NC, Fa. Schleicher & Schuell) sowie 15 3MM-Whatman-Papiere auf Trenngelgrösse zurechtgeschnitten waren, tränkte man sechs dieser Papiere in Kathodenpuffer und applizierte sie luftblasenfrei auf die Kathode. Nun folgte ebenso luftblasenfrei das Trenngel und darüber die in Anodenpuffer A befeuchtete NC-Membran. Diese Anordnung wurde analog überschichtet mit 3 Whatman-Papieren, in Anodenpuffer A getränkt, und mit 6 Whatman-Papieren, in Anodenpuffer B getränkt. Die Graphitanode wurde auf die Anordnung platziert und eine Stromdichte von 0,8 mA/cm² angelegt. Die Transferzeit betrug 30 – 45 min. Nach beendetem Transfer wurde der Teil über der NC-Folie abgebaut, die Laufspuren mit einem Skalpell markiert und der weiteren Verwendung zugeführt.

2.17. Immunfärbung von Proteinen

Um aufgetrennte Proteine auf einer Nitrocellulose-Membran nachzuweisen, wurde die Membran nach dem Blotten sofort unter Schütteln in TBST-Puffer gewaschen (3 x 5 min, RT) um die Transferpuffer zu entfernen. Anschliessend wurde die Membran 1 h in Blockierungspuffer inkubiert um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach weiteren Waschschritten mit TBST-Puffer (3 x 5 min, RT) wurde die Antikörperlösung aufgebracht, je nach Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 5000 bis 1 : 20000. Nach mindestens einstündiger Inkubation folgte ein weiteres dreimaliges Waschen der Membran in TBST, anschliessend wurde der alkalische-Phosphatase-gekoppelte Zweitantikörper aufgetragen (Verdünnung zwischen 1 : 500 bis 1 : 2000, 1 h, RT), gefolgt von weiterem Waschen. Die Detektion erfolgte im Dunkeln durch eine NBT/BCIP-Lösung, die Membran wurde unter optischer Kontrolle inkubiert, bis sich deutliche Banden zeigten. Dann wurde die Reaktion mit Hilfe von Wasser gestoppt und das Ergebnis gesichert.

2.18. Immunfärbung von Zellen

Auf Labteks (Fa.) gezogene Zellen wurden mit vorgekühltem (-20° C) Methanol fixiert (4 min, 4° C) ,anschliessend wurde mit PBS durch dreimaliges Aufbringen und Absaugen gewaschen. Der Erstantikörper wurde aufgebracht und ÜN bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Labteks nochmals vorsichtig gewaschen. Ein Biotin-gekoppelter Zweitantikörper wurde eingebracht und die Zellen mindestens 1 h bei RT inkubiert. Die folgenden Schritte erfolgten bei RT, zunächst wurde die Zweitantikörperlösung abgenommen und wiederum gewaschen. Während der Inkubation des Zweitantikörpers wurde die Lösung für die Detektion angesetzt. Zu 5 ml PBS- oder TBS Puffer wurden 50 µl Reagenz A gegeben und gut gemischt, anschliessend wurden 50 µl Reagenz B zugegeben, wiederum gut vermengt und 30 min bei RT inkubiert. Die ABC-Lösung wurde auf die Labteks aufgebracht und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach weiteren Waschen mit TBS wurde die DAB-Lösung aufgetragen, inkubiert und nach visueller Kontrolle die Lösung durch H₂O gestoppt.

2.19. Immunfärbung von Gefrierschnitten

Zur Fixierung wurde eine 4%ige Paraformaldehydlösung bei 4° C vorgekühlt. Die Gefrierschnitte wurden mit dieser Lösung 5 min bei 4° C inkubiert, danach ebenfalls je 5 min mit 70%igem Ethanol und anschliessend mit 96%igem Alkohol. Nach erfolgter

Fixierung wurden die Schnitte mit 3 x mit PBS gewaschen. Zur Inhibierung der endogenen Peroxidase inkubierte man die Schnitte 1 h bei RT mit Peroxidase-blocklösung in einer feuchten Kammer. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit einem PAP-Pen (Fa. RPI) umrandet, danach Blockserum aufgebracht und mindestens 1h, besser 2 –3 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte nochmaliges Waschen (3 x PBST), anschliessend wurde der Erstantikörper aufgebracht und bei 4° C in einer feuchten Kammer ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach erneutem dreimaligem Waschen (PBST) der Biotin-gekoppelte Zweitantikörper aufgebracht und für 1 h inkubiert (RT, feuchte Kammer). Währenddessen wurde die ABC-Lösung zur Detektion angesetzt, mit der die Gefrierschnitte anschliessend inkubiert wurden (1 h, RT). Nach einem letzten Waschschrift (3 x PBST) wurde die Färbereaktion mit DAB-Lösung durchgeführt (2 – 10 min, RT), nach visueller Kontrolle die Reaktion mit H₂O gestoppt und die Schnitte mit DABCO eingedeckelt.

3. Ergebnisse

Das 11 kDa Protein MIA wurde im Zuge der Untersuchung einer Primärkultur einer ZNS-Metastase eines Patienten mit malignem Melanom entdeckt. Dieser Patient wies eine deutlich erhöhte Überlebensdauer auf, sodass sich die Frage stellte, welche Faktoren für die inhibierende Wirkung auf das Melanom verantwortlich sein könnten. Das Protein wurde aus den Zellüberständen der besagten Primärkultur isoliert. Aufgrund der initialen Untersuchungen von Apfel (1992) und Bosserhoff (1995, 1997, 1998) lag ein Teil des Augenmerks dieser Arbeit auf einer fortführenden Untersuchung der Funktion von MIA. Der größte Teil der Arbeit wurde jedoch unter dem Gesichtspunkt der Charakterisierung des Peptids MIA_{splice} bearbeitet, dessen Expression *in vivo* und *in vitro*, sowie das Verhalten nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren, im speziellen TGF- β 2 (transforming growth factor- β 2).

3.1. Klonierung von MIA_{splice}

Nachdem bei einer früheren Northern Blot Untersuchung der mRNA des Proteins MIA eine weitere, schwächere aber doch deutliche Bande in Höhe von ca. 400 bp erschien, wurde nach dem Ursprung für diese zweite Bande gefahndet. Die Gesamt-RNA einer Kultur der Zelllinie HTZ19 wurde isoliert nach der Methode von Chromczynski und Sacchi (1987) und die RNA mit Hilfe der Technik der reversen Transkriptions PCR amplifiziert. Das erhaltene PCR Produkt wurde mit einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membran wurde mit einer MIA-spezifischen, mit ³²P-markierten Sonde hybridisiert und danach autoradiographisch detektiert. Die auf dem Southern Blot erschienene zweite, kleinere Bande wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, elektroeluiert und in den Vektor pQE40 (Fa. Stratagene, Abb. 3.1.) kloniert. Nach Transformation des Klonierungsvektors und der Extraktion der Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1997) wurde das inserierte DNA-Fragment mittels der Methode von Sanger et al (1977) sequenziert.

Ein Vergleich mit der Originalsequenz zeigte, dass es sich dabei um eine Splice-Variante des Proteins MIA handelt. Die Nukleotidsequenz der beiden mRNAs ist identisch bis auf einen 134 bp langen Bereich, der das Exon 2 der MIA Sequenz umfasst, beginnend bei Nukleotid 199 bis einschließlich Nukleotid 332. Daraus ergibt sich ein Frame Shift in der Aminosäuresequenz und somit eine unterschiedliche C-

terminale Proteinsequenz. Das transkribierte Peptid hat eine Länge von 36 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ca 3.5 kDa

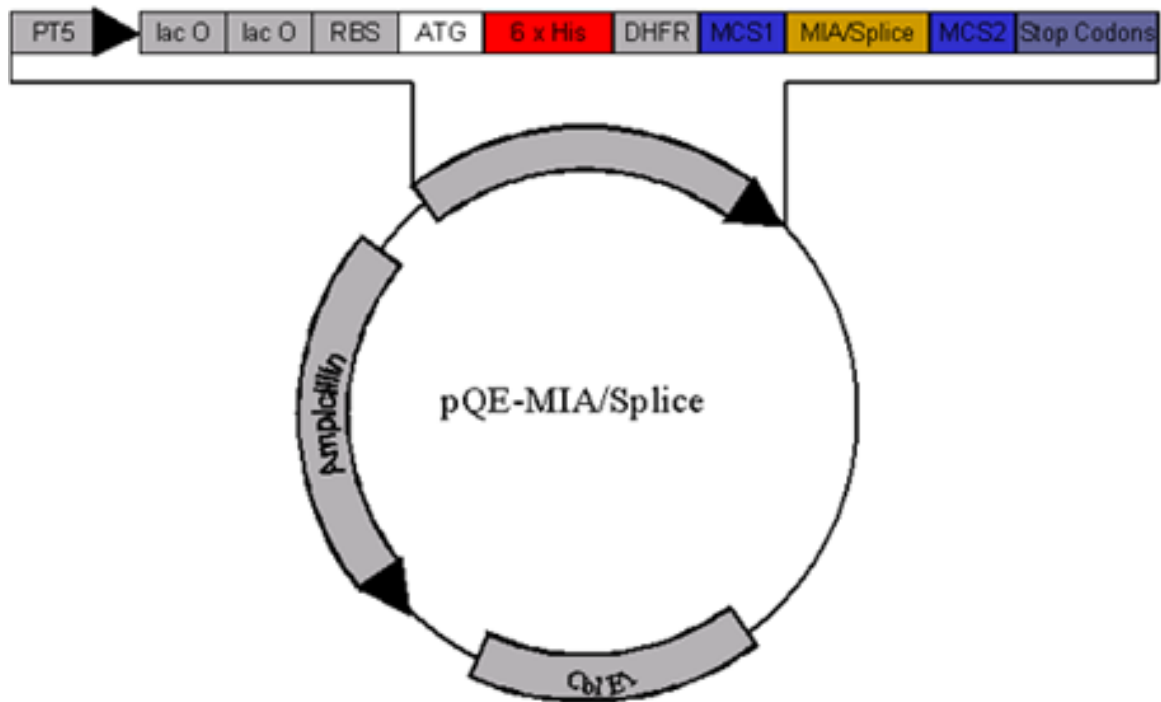


Abb. 3.1: MIA_{splice} in pQE-40

MIA_{splice} wurde in den Vektor pQE-40 kloniert. Der Vektor enthält die Gensequenz für Ampicillin-Resistenz sowie einen Replikationsorigin. MIA_{splice} wurde in die Klonierungssite eingesetzt. Diese folgt auf einen T5 Promotor, ein Lactose-Operon, einen T5 Replikationsstart, die Kodierungssequenz für sechs Histidine so wie für Dihydrofolatreduktase. Der Klonierungsstelle sind mehrere Stop-Codons angeschlossen.

1	A G G G A G A G A G G G A G G G G A G G A A A T T G G A G A C C C C A G C A C C	MIA -cDNA
1	A G G G A G A G A G G G A G G G G A G G A A A T T G G A G A C C C C A G C A C C	MIA-splice cDNA
		Met Ala Arg
41	C C C T T G C T C A C T C T C T T G C T C A C A G T C C A C G A T G G C C C G G	MIA -cDNA
41	C C C T T G C T C A C T C T C T T G C T C A C A G T C C A C G A T G G C C C G G	MIA-splice cDNA
		Ser Leu Val Cys Leu Gly Val Ile Ile Leu Leu Ser Ala Phe
81	T C C C T G G T G T G C C T T G G T G T C A T C A T C T T G C T G T C T G C C T	MIA -cDNA
81	T C C C T G G T G T G C C T T G G T G T C A T C A T C T T G C T G T C T G C C T	MIA-splice cDNA
		Ser Gly Pro Gly Val Arg Gly Gly Pro Met Pro Lys Leu
121	T C T C C G G A C C T G G T G T C A G G G G T G G T C C T A T G C C C A A G C T	MIA -cDNA
121	T C T C C G G A C C T G G T G T C A G G G G T G G T C C T A T G C C C A A G C T	MIA-splice cDNA
		Ala Asp Arg Lys Leu Cys Ala Asp Gln Glu Cys Ser His
161	G G C T G A C C G G A A G C T G T G T G C G G A C C A G G A G T G C A G C C A C	MIA -cDNA
161	G G C T G A C C G G A A G C T G T G T G C G G A C C A G G A G T G C A G C C - -	MIA-splice cDNA
		Pro Ile Ser Met Ala Val Ala Leu Gln Asp Tyr Met Ala
201	C C T A T C T C C A T G G C T G T G G C C C T T C A G G A C T A C A T G G C C C	MIA -cDNA
199	- -	MIA-splice cDNA
		Pro Asp Cys Arg Phe Leu Thr Ile His Arg Gly Gln Val Val
241	C C G A C T G C C G A T T C C T G A C C A T T C A C C G G G G C C A A G T G G T	MIA -cDNA
199	- -	MIA-splice cDNA
		Tyr Val Phe Ser Lys Leu Lys Gly Arg Gly Arg Leu Phe
281	G T A T G T C T T C T C C A A G C T G A A G G G C C G T G G G C C G C T C T T C	MIA -cDNA
199	- -	MIA-splice cDNA
		Trp Gly Gly Ser Val Arg Ser Gly Arg Leu Leu Trp Arg Ser Gly
321	T G G G G A G G C A G C G T T C A G G G A G A T T A C T A T G G A G A T C T G G	MIA -cDNA
199	- -	MIA-splice cDNA
		Cys Ala Ser Arg Pro Leu Gly Gly Leu Tyr Phe Phe Pro Gln Ser Ser Ile Val Arg Glu
361	C T G C T C G C C T G G G C T A T T T C C C C A G T A G C A T T G T C C G A G A	MIA -cDNA
227	C T G C T C G C C T G G G C T A T T T C C C C A G T A G C A T T G T C C G A G A	MIA-splice cDNA
		Asp Gln Thr Leu Lys Pro Gly Lys Val Asp Val Lys Thr
401	G G A C C A G A C C C T G A A A C C T G G C A A A G T C G A T G T G A A G A C A	MIA -cDNA
267	G G A C C A G A C C C T G A A A C C T G G C A A A G T C G A T G T G A A G A C A	MIA-splice cDNA
		Asp Lys Trp Asp Phe Tyr Cys Gln *
441	G A C A A A T G G G A T T T C T A C T G C C A G T G A G C T C A G C C T A C C G	MIA -cDNA
307	G A C A A A T G G G A T T T C T A C T G C C A G T G A G C T C A G C C T A C C G	MIA-splice cDNA
481	C T G G C C C T G C C G T T T C C C C T C C T T G G G T T T A T G C A A A T A C	MIA -cDNA
347	C T G G C C C T G C C G T T T C C C C T C C T T G G G T T T A T G C A A A T A C	MIA-splice cDNA
521	A A T C A G C C C A G T G C A A A C	MIA -cDNA
387	A A T C A G C C C A G T G C A A A C	MIA-splice cDNA

Abb. 3.2: Sequenz von MIA/MIA_{splice}

Sequenzierung der putativen Splice-Variante zeigt die Sequenzidentität zu MIA/CD-Rap. Der 134 bp lange Bereich des Exons 2 der Originalsequenz fehlt, was zu einem Frame Shift führt. Die bei MIA/MIA_{splice} identischen Aminosäuren sind regulär gedruckt, schrägedruckt ist die MIA-spezifische Aminosäuresequenz und die hell gedruckte Sequenz ist die C-terminale MIA_{splice} Proteinsequenz.

3.2. Expression von MIA und MIA_{splice} in pQE-40

Nach der gelungenen Klonierung der Fragmente von MIA und MIA_{splice} in den Vektor pQE-40 (FA. Qiagen) und nachfolgender Transfektion in das Wirtsbakterium *E. coli* XL I Blue, wurde versucht die Expression des Peptids zu induzieren. Der Vektor pQE-40 wurde aus mehreren Gründen gewählt. Erstens enthält der Vektor eine N-terminale Consensus-Sequenz zur Transkription einer Poly-Histidinkette. Dies ermöglicht eine einfache Detektion des gewünschten Proteins mittels eines Anti-His Antikörpers und ebenso die spezifische Isolierung des Proteins durch Nickel-Nitriloessigsäure- (Ni-NTA-) Matrizen, wie z. Bsp. Zentrifugations-Chromatographie-säulen. Außerdem enthält der Vektor die Transkriptionssequenz des Dihydrofolatreduktase-Gens (DHFR). Kurze Peptide können oft nicht erfolgreich in Bakterien exprimiert werden, da sie sich nicht richtig falten und somit proteolytischer Degradation zum Opfer fallen. Die Addition von DHFR vor Beginn der eigentlichen Zielsequenz verhindert diese Konstellation. Nach erfolgter Expression lassen sich die Histidinkette und DHFR relativ einfach von dem eigentlichen Produkt abtrennen.

Die Induktion der Transkription erfolgt in diesem System durch Zugabe von 1mM IPTG, welches den lac-Repressor des Systems bindet und somit die vormals unterdrückte Transkription startet.

Die Proteine MIA und MIA_{splice} wurden laut Protokoll des Herstellers in LB/Amp Vollmedium über Nacht (ÜN) angezogen und bei Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,5 – 0,7 mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiterer, fünfstündiger Inkubation wurden die Zellen pelletiert und das Protein MIA bzw. das Peptid MIA_{splice} isoliert.

Das Ergebnis dieses Experiments war nicht den Erwartungen entsprechend. Die Zellen, die das Protein MIA exprimierten, wuchsen verhältnismäßig normal, während die MIA_{splice}exprimierenden Bakterienzellen nur die Hälfte der optischen Dichte im Vergleich zu den MIA exprimierenden Zellen im gleichen gegebenen Zeitraum erreichten. Dies deutet auf eine toxische Wirkung von MIA_{splice} auf die Bakterien hin. Außerdem waren beide Produkte in Einschlusskörpern (inclusion bodies) eingelagert. Obwohl in Bakterienlysaten sowohl das Protein MIA als auch das Peptid MIA_{splice} nachgewiesen werden konnte, führten auch unterschiedlichste Modifizierungen des Protokolls nicht zur Isolierung einer zufrieden stellenden Menge an Protein oder Peptid (Abb. 3.3).

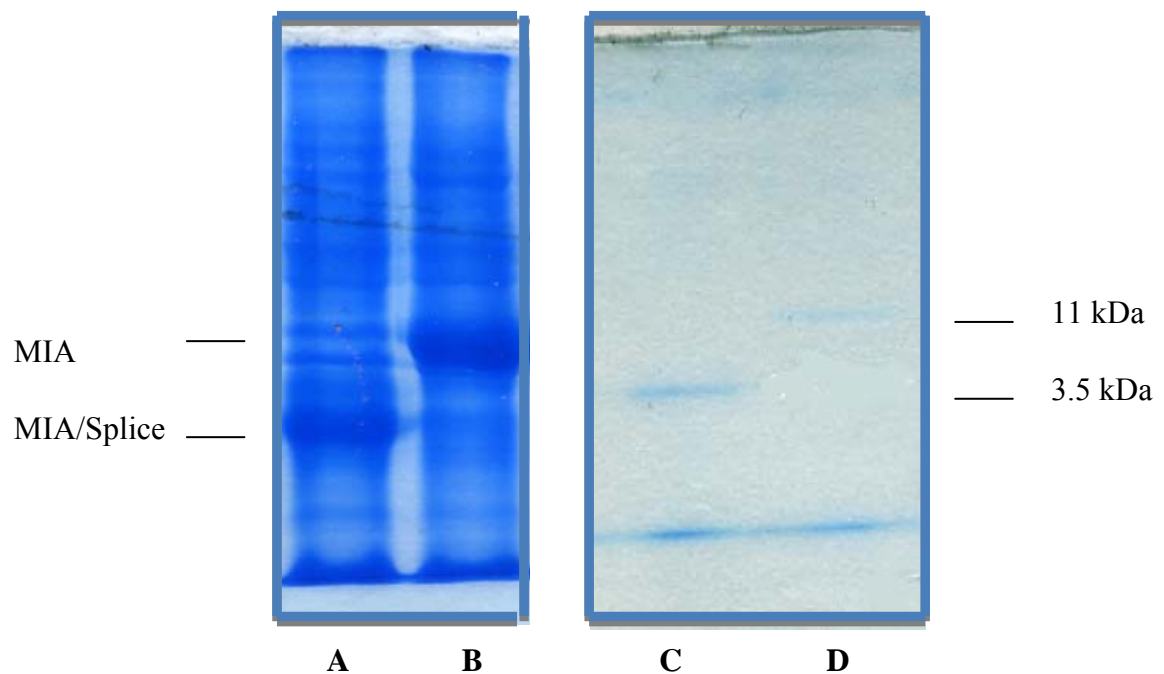


Abb. 3.3.: Bakteriell exprimiertes MIA und MIA_{splice}

In *E. coli* transformierte Expressionsvektoren von MIA und MIA_{splice} zeigten nach Induktion der Bakterien die gewünschten Proteine im Bakterienlysate (links). Nach Aufbrechen der Inclusion bodies und Aufreinigung der Proteine mittels Ni-NTA Chromatographiesäulen waren die Proteine im SDS Page Gel durch Coomassiefärbung kaum noch nachzuweisen, die ursprüngliche Konzentration wurde ca. um den Faktor 10 verringert.

3.3. Northern Blotting

Um die Existenz des Splice-Produkts vom MIA nachzuweisen, wurde die Methode des Northern Blot mit einem nicht radioaktiven System gewählt. Die Wahl fiel auf das Digoxigenin (DIG) System, das alle Vorteile der radioaktiven Methode aufweist, jedoch deren Nachteile wie radioaktiven Abfall und dessen Beseitigung, lange Versuchszeiten und Instabilität der Probe umgeht.

Das DIG System basiert auf dem Steroidhapten Digoxigenin, einem Aglucon des Steroids Digoxin, das in einigen Digitalis - Pflanzen vorkommt. Aus zwei Gründen ist das DIG Molekül für Detektionssysteme besonders geeignet. Wenn DIG als Hapten an ein passendes Transportmolekül gebunden ist, können leicht hoch affine Antikörper z. Bsp. in Schafen erzeugt werden. Da DIG ausschließlich in Digitalis – Pflanzen natürlich vorkommt, ergeben sich Probleme durch endogenen Hintergrund mit diesen Antikörpern nicht, was bei anderen Haptenen, wie Biotin, möglich ist. Außerdem kann DIG über eine alkalilabile Esterbindung bei Verwendung gebräuchlicher Polymerasen wie Klenow Polymerase, Taq Polymerase oder RNA Polymerasen an Nukleotide wie dUTP oder UTP gekoppelt und in Nukleinsäuren inkorporiert werden. Aufgrund der alkalilabilen Bindung ist DIG leicht ablösbar und somit mit einer anderen Sonde hybridisierbar.

Die Detektion wurde chemilumineszent mit Hilfe des Substrats CSPD durchgeführt. CSPD ist ein Dioxetan, das durch enzymatische Dephosphorylierung in ein metastabiles Phenolat-Anion umgewandelt wird, welches zerfällt und Lichtenergie der Wellenlänge 477 nm frei setzt. CSPD hat gegenüber ^{32}P -dCTP den Vorteil, dass die Expositionszeiten deutlich geringer sind und die Lumineszenz für mehrere Tage sich auf einem gleich bleibenden Plateau bleibt (Abb. 3.4.; 3.5.)

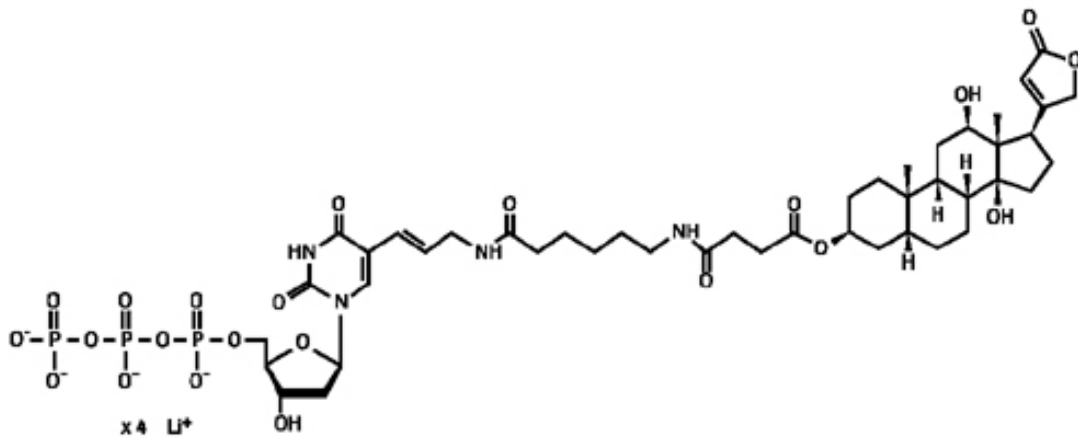


Abb. 3.4: Struktur von alkali-labilem DIG-11-dUTP

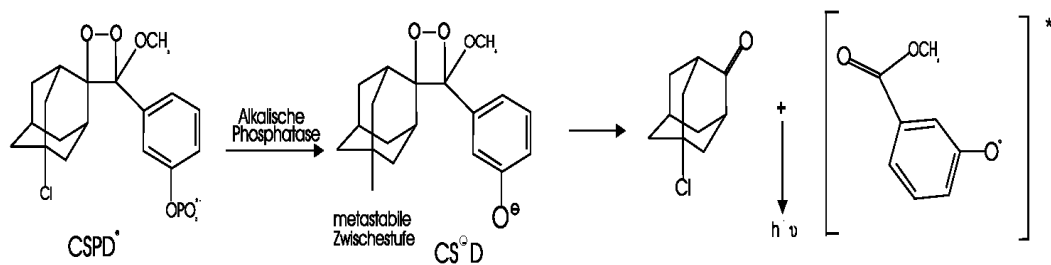


Abb. 3.5: Struktur und Zerfallsreaktion von CSPD

Durch enzymatische Dephosphorylierung wird CSPD in ein metastabiles Phenolat-Anion umgewandelt, zerfällt und setzt Lichtenergie der Wellenlänge 477 nm frei.

Aus Zellen der Linien HTZ-19 und HTZ-23 wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits (Fa. QIAGEN®) die Gesamt RNA isoliert. Die Entscheidung für diese Zelllinien lag darin begründet, dass MIA aus der Linie HTZ-19 zum ersten Mal isoliert wurde und dass die Expression von MIA in HTZ-23 ebenfalls sehr hoch war. Jeweils 20 µg RNA wurden auf ein denaturierendes Agarosegel aufgebracht und aufgetrennt. Wie zuvor beschrieben wurde die RNA ÜN auf eine positive geladene Membran gebロットet und anschließend mit einer mit DIG-markierten Sonde hybridisiert. Als Sonde wurde ein Fragment von 194 bp der Sequenz von MIA und MIA_{splice} gewählt, beginnend am 5'-Ende der Sequenz bis zur putativen Splice Stelle (Abb. 3.6.). Als Positivkontrolle diente β-Aktin. Die Signale wurden mit CSPD (Fa. Roche, Abb. 3.5.) chemilumineszent detektiert und per Autoradiographie visualisiert.

Neben der positiven Kontrollbande für β-Aktin erschienen in beiden Spuren zwei weitere Banden. Die MIA-spezifische Bande erschien in der Höhe des Molekulargewichts von 539 bp, die Bande für MIA_{splice} in Höhe von 409 bp (Abb. 3.7.). Dies entspricht der Größe der zuvor isolierten und klonierten cDNA-Fragmente und bestätigt somit die Existenz von MIA_{splice}.

MIA-fwd →

1 AGGGAGAGAG GGAGGGGAGG AAATTGGAGA CCCCAGCACC CCCTTGCTCA
51 CTCTCTTGCT CACAGTCCAC GATGGCCCGG TCCCTGGTGT GCCTTGGTGT
101 CATCATCTTG CTGTCTGCCT TCTCCGGACC TGGTGTGAGG GGTGGTCCTA
151 TGCCCAAGCT GGCTGACCGG AAGCTGTGTG CGGACCAGGA GTGCAGCC

← MIA-rev

MIA-fwd: 5'-AGG GAG AGA GGG AGG GGA GG-3' $T_m = 68^\circ \text{ C}$

MIA-rev: 5'-GCA CTC CTG GTC CGC ACA CA-3' $T_m = 66^\circ \text{ C}$

Abb. 3.6.: Hybridisierungs-Sonde

Als Hybridisierungs-Sonde für den Northern Blot wurde ein PCR-amplifiziertes MIA-Fragment benutzt, das vom 5'-Ende bis zur putativen Splice Stelle ging.

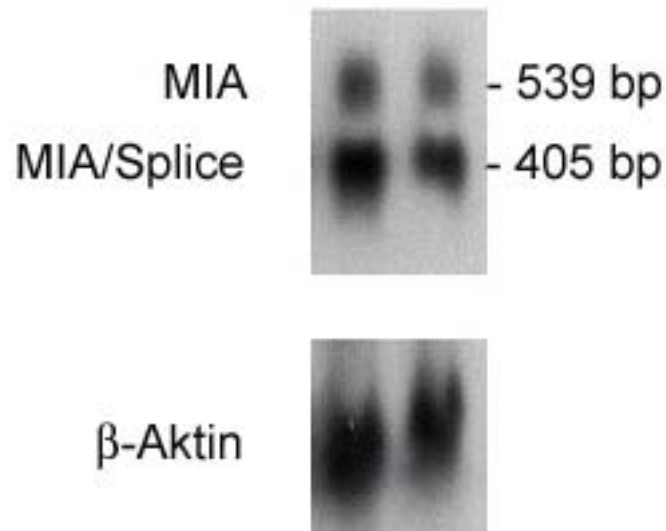


Abb. 3.7.: Northern Blot von *MIA* und *MIA_{splice}*

Nach Hybridisierung der Zelllinien HTZ-19 und HTZ-23 mit einem 5′-Fragment von MIA wurden in beiden Spuren zwei Banden sichtbar. Die obere Bande kennzeichnet MIA, die untere MIA_{splice}. Als Positivkontrolle wurde β-Aktin gewählt.

3.4. cDNA Screening

Auf den Nachweis der Existenz der Splice-Variante von MIA durch den Northern Blot folgte die Überlegung, in welchen Geweben MIA_{splice} exprimiert werden könnte. Aufgrund der Tatsache, dass MIA im adulten Stadium ausschließlich in Tumorzellen exprimiert wird, hauptsächlich in Tumoren melanozytären Ursprungs und - deutlich geringer - in diversen anderen Tumoren, wurden die ersten weiterführenden Untersuchungen mit cDNA Untersuchungen diverser Tumorzelllinien per PCR Screening durchgeführt.

Untersucht wurden folgende cDNA Proben:

Naevi	A1 – 6
Melanome, Primärtumoren ohne viszerale Metastasierung	B1 – 5
Primärtumoren metastasierender Melanome	C1 – 12
Systemische Melanom-Metastasen	D1 – 10
ZNS Melanom-Metastasen	E1 – 4
Melanom Primärkulturen	F1 – 8
Kontrollen	G1 – 8

Bei den Kontrollen handelte es sich um Basaliome (G1 – 4), Endothel (G5), gesundes Darmgewebe (G6), Kolitisgewebe (G7) und Gewebe eines Darmkarzinoms (G8).

Für die Amplifikation vom MIA wurde ein fwd-primer entworfen, der sich über Schnittstelle der Exons 2 und 3 erstreckt. Im Gegenzug ging der MIA_{splice} Primer über die Bindestelle von Exon 1 und 3, da durch das unterschiedliche Splicing Exon 2 verloren geht. Die rev-Primer erstreckten sich von bp 409 – 423 (MIA-rev) bzw. von bp 411 – 425 (MIA/Splice-rev, Abb. 3.8.). Nach einem PCR – Lauf von 32 Zyklen wurde eine MIA-spezifische Bande von 100 bp erwartet. Die MIA_{splice}-Bande hatte eine erwartete Grösse von 114 bp. Die amplifizierten Fragmente wurden durch Sequenzierung verifiziert. Als semiquantitative Vergleichsgröße wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase- (GAPDH) Expression gewählt.

```
1  AGGGAGAGAG GGAGGGGAGG AAATTGGAGA CCCCAGCACC CCCTTGCTCA
51 CTCTCTTGCT CACAGTCCAC GATGGCCCGG TCCCTGGTGT GCCTTGGTGT
101 CATCATCTTG CTGTCTGCCT TCTCCGGACC TGGTGT CAGG GGTGGTCCTA
151 TGCCCAAGCT GGCTGACCGG AAGCTGTGTG CGGACCAGGA GTGCAGCCAC
                                     MIA/Splice-fwd
201 CCTATCTCCA TGGCTGTGGC CCTTCAGGAC TACATGGCCC CCGACTGCCG
                                     MIA-fwd
251 ATTCCTGACC ATTCACCGGG GCCAAGTGGT GTATGTCTTC TCCAAGCTGA
                                     MIA-rev
301 AGGGCCGTGG GCGGCTCTTC TGGGGAGGCA GCGTTCAGGG AGATTACTAT
                                     MIA/Splice-rev
351 GGAGATCTGG CTGCTCGCCT GGGCTATTTT CCCAGTAGCA TTGTCCGAGA
401 GGACCAGACC CTGAAACCTG GCAAAGTCGA TGTGAAGACA GACAAATGGG
451 ATTTCTACTG CCAGTGAGCT CAGCCTACCG CTGGCCCTGC CGTTTCCCCT
501 CCTTGGGTTT ATGCAAATAC AATCAGCCCA GTGCAAAC
```

Abb. 3.8.: Primer des PCR-Screenings

Der MIA-fwd Primer erstreckt sich über die Schnittstelle von Exon 1 und 2, der Primer für MIA_{splice} aufgrund des Verlustes von Exon 2 über die Schnittstelle der Exone 1 und 3.

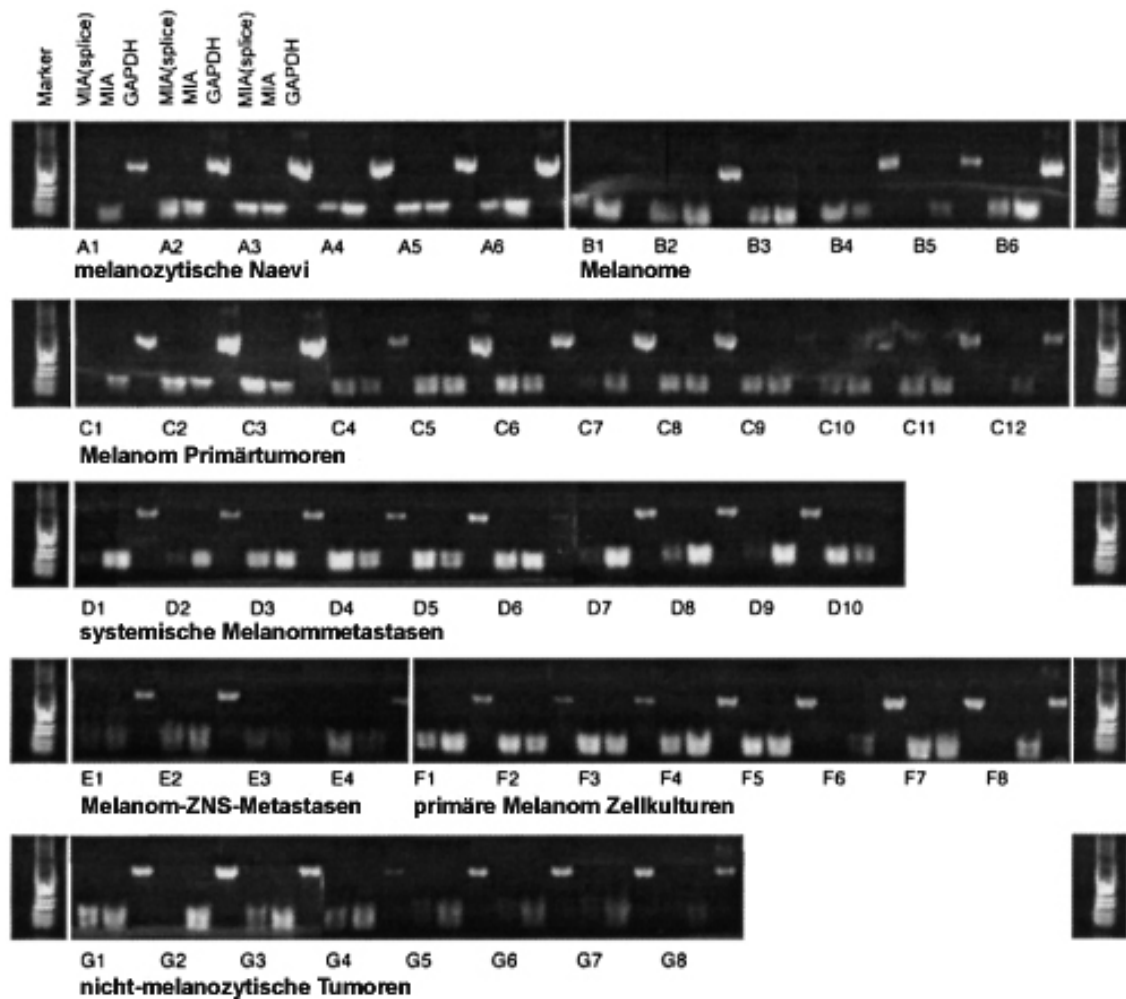


Abb. 3.9.: PCR Screening von MIA und MIA_{splice}

Ein PCR Screening von cDNA's transkribiert von melanozytischen Geweben und Tumoren zeigt die Expression von MIA und MIA_{splice} im Vergleich. GAPDH wurde als semiquantitative Vergleichsgröße gewählt. Die Expression von MIA_{splice} korreliert stark mit der des initialen MIA Proteins. In nicht-melanozytären, MIA-positiven Kontrollen dagegen ist die Expression von MIA_{splice} im Gegensatz zu MIA relativ gering.

	MIA _{splice} mRNA	MIA mRNA
	Expression	Expression
Naevi		
A1	-	+++
A2	++++	+++++
A3	++++	++++
A4	++	+++++
A5	++++	++++
A6	+++	+++++
Melanoma		
B1	++	++++
B2	++	+++
B3	++	+++
B4	+++	++
B5	-	+
B6	++	+++
Primärkulturen metastasierender Melanome		
C1	-	+
C2	++++	++++
C3	+++++	+++
C4	+	+
C5	++	++
C6	+++	++
C7	+	++
C8	++	++
C9	++	++
C10	++	++
C11	++	++
C12	+	+
Systemische Melanommetastasen		
D1	+	++++
D2	+	+++
D3	+++	++++
D4	+++++	+++
D5	++++	+++
D6	++++	++++

	MIA _{splice} mRNA	MIA mRNA
	Expression	Expression
Systemische Melanommetastasen		
D7	++	++++
D8	++	++++
D9	+	++++
D10	+++	++
ZNS Melanommetastasen		
E1	+	+
E2	+	++
E3	+	+
E4	++	+
Melanom Primärkulturen		
F1	+++	++++
F2	++++	+++
F3	++++	+++
F4	+++	++++
F5	++++	+++
F6	-	+
F7	++++	+++
F8	-	++
Kontrollen		
G1	++	+++
G2	-	+++
G3	+	+++
G4	+	++
G5	+	+++
G6	+	+++
G7	+	+++
G8	+	++

Tab. 3.1.: Expression von MIA und MIA_{splice}

Die Expression von MIA und MIA_{splice} wurde semiquantitativ im Vergleich zur GAPDH Expression in unterschiedlichen Tumoren melanotytären Ursprungs bestimmt.

Nach Auftrennung der amplifizierten Fragmente auf einem 1% Agarosegel wurde die Intensität der Banden im Vergleich zur ebenfalls amplifizierten GAPDH-Bande ermittelt. Die Intensität wurde in fünf unterschiedlichen Graden beurteilt, wie in Tab. 3.1. zu sehen ist.

Die Expression von MIA mRNA in Naevi ist ebenso wie die Expression von MIA_{splice} sehr stark, wobei die Expression des initialen MIA Proteins noch stärker war als die der Splice-Variante. Die Expression beider Proteine in Melanomzellen war deutlich, wenn auch ein wenig geringer als in den Proben der Naevi beobachtet. Allerdings war auch hier die MIA Expression im Vergleich erhöht. Die Untersuchung von Primärkulturen metastasierender Melanome ergab bei beiden Proteinen unterschiedlichste Expressionsintensitäten, von fehlender Expression bis zum stärksten Expressionsgrad. Es war kein Unterschied zwischen MIA und MIA_{splice} zu erkennen. Die Expression von MIA_{splice} in systemischen Melanommetastasen war leicht bis mittelstark, Expression von MIA wiederum deutlich stärker mit mittlerer bis starker Intensität. ZNS Melanommetastasen zeigten dagegen bei beiden Proteinen nur geringe Expression. Die mRNA-Expression von MIA wie auch MIA_{splice} in Primärkulturen von Melanomen hingegen war stark ohne signifikante Unterschiede. Die Intensität der MIA_{splice} Expression in den Kontrollgeweben war nicht vorhanden oder gering, die der MIA Expression hingegen erhöht bis zu einer mittelstarken Intensität.

Alles in allem scheint die Expression von MIA_{splice} stark mit der Expression des initialen MIA Proteins zu korrelieren. Das Verhältnis von MIA zu MIA_{splice} ist in fast allen insoweit getesteten Primärkulturen melanozytären Ursprungs konstant. In den nicht-melanozytären, MIA-positiven Kontrollen dagegen ist die Expression von MIA_{splice} im Gegensatz zu MIA relativ gering.

3.5. MIA und MIA_{splice} Western Blot

Da sich die Spleißvariante von MIA von dem maternalen Protein durch einen Frame Shift, eine Verschiebung der Aminosäuresequenz, unterscheidet, sollten bei Verwendung eines N-terminalen Antikörpers MIA und MIA_{splice} markiert werden. Bei Verwendung eines C-terminalen Antikörpers gegen MIA dagegen sollte die MIA_{splice} Bande nicht auf dem Western Blot erscheinen.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Zelllysate mehrerer Tumorzelllinien über ein SDS-Page Gel aufgetrennt und die Proteinanteile mittels eines Western Blots auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Bei den Zelllinien handelte es sich einerseits um die Melanom Zelllinie CRL-1424 (ATCC, Virginia, USA), andererseits die Linien HTZ-19, HTZ-308, HTZ-209 und HTZ-249. Bei letzteren handelt es sich um Zelllinien von Zerebralmetastasen humaner maligner Melanome und Linien von humanen malignen Gliomen. Diese Zellen stammten aus der Tumorbank unseres Instituts. Die Antikörper wurden freundlicherweise von der Firma Roche, Mannheim, zur Verfügung gestellt.

Pro Spur wurden 20 µl Zellysate aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss daran geblottet und die Membran mit entweder dem N-terminalen MIA Antikörper oder dem C-terminalen Pendant inkubiert.

Nach kolorimetrischer Detektion zeigte sich, dass bei dem Blot, der mit dem N-terminalen MIA-Antikörper inkubiert worden war, in allen Spuren zwei Banden vorhanden waren. Die obere Bande lief in Höhe von 11 kDa, was dem Molekulargewicht dem maternalen MIA Proteins entspricht, die untere in Höhe von ca. 4 kDa. Dies korrespondiert mit der vorhergesagten Größe der Spleißvariante von MIA. Die Intensität der Banden war unterschiedlich bei den einzelnen Zelllinien, das Verhältnis der Banden innerhalb einer Linie jedoch konstant. Die Intensität von MIA_{splice} im Gegensatz zu MIA war geringer (Abb. 3.10.).

Die Analyse des Western Blots, der mit dem C-terminalen MIA Antikörper behandelt wurde, zeigte nur eine Bande bei 11 kDa. Dies verifiziert die oben genannte Hypothese und untermauert die Existenz von MIA_{splice}.

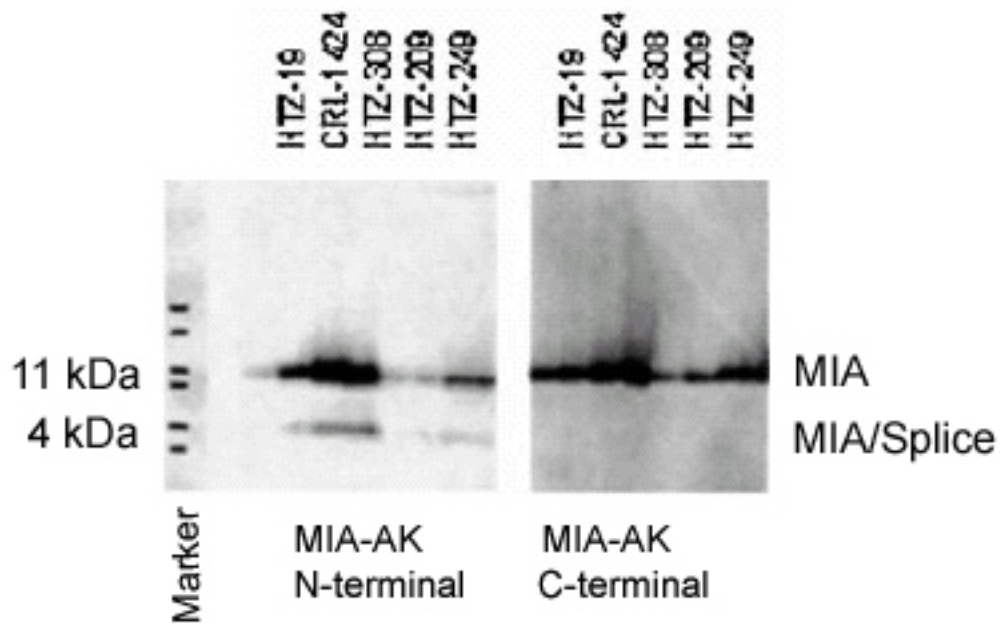


Abb. 3.10.: Western Blot zur Identifikation von MIA und MIA_{splice}

Die Western Blot Analyse von Lysaten verschiedener Zelllinien maligner Melanome und Gliome mit einem N- bzw. C-terminalem Antikörper gegen MIA unterstützt die Hypothese der Existenz von MIA_{splice}.

3.6. MIA_{splice} Antikörper Herstellung

Um MIA_{splice} in Gewebe und Zellen nachweisen zu können, bestand die Notwendigkeit, einen MIA_{splice} spezifischen Antikörper herzustellen. Die Wahl fiel auf die Generierung eines polyklonalen Antikörpers in Kaninchen.

Als Antigen für die Immunisierung des Kaninchens wurde die gesamte Peptidsequenz von MIA_{splice} synthetisiert (Fa. MWG, München). Um eine gesteigerte Immunogenität des Tieres zu erreichen, werden diese in der Regel an ein Carrier-Molekül gekoppelt. Hierzu wurde standardmäßig BSA (Bovine Serum Albumin) verwendet. Die Kaninchen wurden nach einem Standardprotokoll von der Firma QCB (Hopkinton, MA, USA) immunisiert: Vor der ersten Injektion wurde das Präimmunserum entnommen, die Injektion des Antigens erfolgten an den Tagen 0, 28, 42 und 56. Serumkontrollen wurden an den Tagen 38 und 52 entnommen, die Endblutung erfolgte an Tag 70. Das gewonnene Antiserum wurde mit Ammoniumsulfat präzipitiert, dialysiert und mit Hilfe einer Affinitätschromatographie gereinigt.

Der Antikörper gegen MIA_{splice} wurde zuerst mit Hilfe eines Dot Bots auf seine Spezifität gegen das Antigen getestet. Konzentrationen von 1, 0,5, 0,2 und 0,1 µg wurden auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert und anschließend mit dem einer 1:1000 verdünnten Antikörperlösung inkubiert. Detektiert wurde genau wie bei der Western Blot Methode mit einem an alkaline Phosphatase (AP) gekoppelten sekundären Antikörper und dem Substratkomplex NBT/BCIP (Fa. Roche).

Wie in Abb. 3.11 zu sehen ist, war das Ergebnis des Dot Blots den Erwartungen entsprechend, die Intensität der Signale ist den aufgetragenen Konzentrationen ungefähr equivalent.

Zum weiteren Nachweis der Spezifität wurde ein Western Blot mit Lysaten der Zelllinie HTZ-19 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Antigen, das zur Immunisierung der Hasen verwendet wurde, gewählt, während als Fibroblastenlysat Negativkontrolle diente. 50 µg Gesamtprotein wurden pro Spur geladen, separiert und danach auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach Inkubation der Membran mit Antikörperlösung in 1:1000 Verdünnung wurde die Detektion durchgeführt wie beim Dot Blot beschrieben.

Die erhaltenen Signale lagen bei einem Molekulargewicht von 4 kDA, ebenso wie bei der Western Blot Analyse mit dem N-terminalen MIA-Antikörper, allerdings war wie erwartet nur eine Bande sichtbar (Abb. 3.12.). Somit war die Spezifität des Antikörpers nachgewiesen.

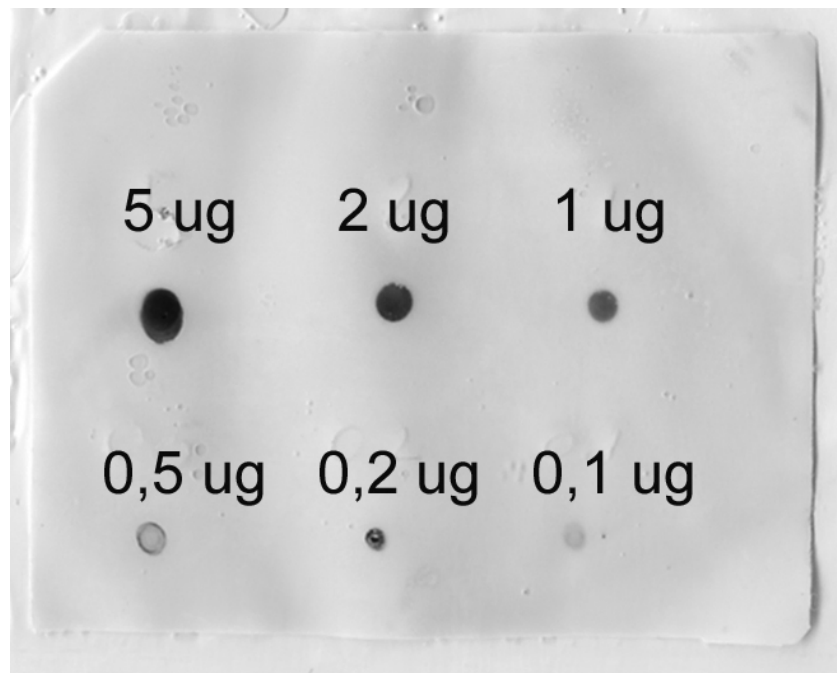


Abb. 3.11.: *Dot Blot MIA_{splice}*

Um die Spezifität des Antikörpers gegen MIA_{splice} zu testen wurden verschiedene Konzentrationen des Antigens auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert. Das Ergebnis zeigt die erwartete graduelle Abschwächung des detektierten Signals.

HTZ-19 CRL-1424 Fibroblast

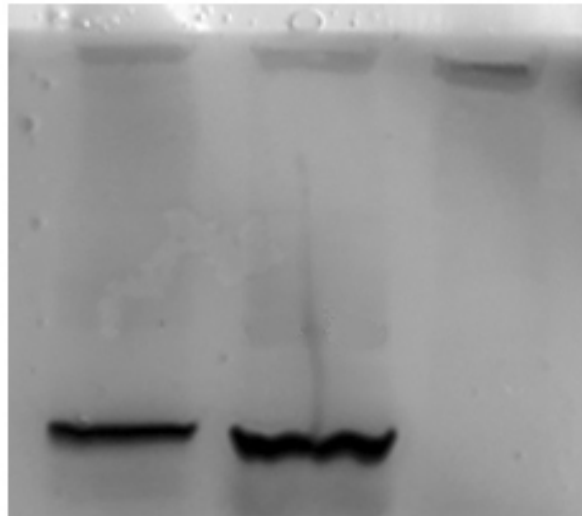


Abb. 3.12.: Western Blot MIA_{splice}

Zur weiteren Demonstration der Antikörperspezifität wurde ein Western Blot durchgeführt mit Lysaten der Zelllinien HTZ-19, CRL-1424 und einer Fibroblastenkultur. Das Ergebnis zeigt ein einzelnes Signal in den Spuren der Tumorzelllinien und kein Signal in der Spur der Negativkontrolle.

3.7. Induktion von Chondrogenese mit MIA und TGF- β 1

Das Protein MIA ist auch bekannt als Chondrocyte Derived Retinoic Acid Regulated Protein (CD-RAP). Neben der Expression *in vivo* in melanozytären Tumoren ist es außerdem beschränkt auf Zonen des Knorpel/Knochenübergangs in der Embryogenese. Das Protein Otoraplin, ein 60%iges MIA Homolog der MIA-Familie, ist funktionell für die Knorpelentstehung im Mittelohr verantwortlich.

Zum Nachweis der Regulation von MIA durch TGF- β 1 wurden mesenchymale, hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark (CD 34) isoliert. Die Anzucht erfolgte in DMEM Medium ohne FCS unter Zugabe folgender Wachstumsfaktoren: ITS+3, Natriumpyruvat, Dexametason und Ascorbinsäure. Die Zellen wurden anschließend behandelt wie folgt:

- + TGF- β 1
- - TGF- β 1
- + TGF- β 1 + MIA (c= 50 ng)
- - TGF- β 1 + MIA
- + TGF- β 1 + MIA antisense (c= 10 μ M)
- - TGF- β 1 + MIA antisense
- + TGF- β 1 + MIA nonsense
- - TGF- β 1 + MIA nonsense

Nach Beginn des Versuchs wurden die Kulturen an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 20 mit Hilfe einer Toluidinfärbung auf die Bildung von Knorpelgewebe untersucht. Ebenfalls wurde die Konzentration von MIA im Serum mit einem MIA-ELISA (Fa. Boehringer) untersucht. Die Ergebnisse sind im Detail in Tabelle 3.2. dargestellt. In allen Ansätzen ohne TGF- β 1 war keine Differenzierung zu erkennen. In allen anderen waren die Zellen zu Knorpelmaterial differenziert, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung. In den Versuchen mit TGF- β 1 allein und mit TGF- β 1/MIA war ab Tag 14 ein Signal nach Anfärbung mit Toluidin erkennbar, die Signalstärke war im Zeitverlauf ansteigend. Im Versuchsansatz von TGF- β 1/MIA-AS war ein bereits an Tag 7 eine schwache Färbung der Zellen zu sehen. Im weiteren Verlauf war ebenfalls eine Zunahme des Signals zu beobachten, dieser Versuchsteil führte zum stärksten aller erhaltenen Signale. In allen differenzierten Kulturen war MIA ab Tag 7 im Serum nachweisbar.

Dies belegt, dass die Chondrogenese bei Zugabe von TGF- β 1 induziert wird. Das gleichzeitige Ansteigen der MIA Serumkonzentration wiederum ist durch eine Hochregulation von MIA auf mRNA Ebene erklärbar.

	Tag 1		Tag 3		Tag 7	
	Färbung	MIA-c (ng/ml)	Färbung	MIA-c (ng/ml)	Färbung	MIA-c (ng/ml)
- TGF- β 1	/	0	/	0	/	0
+ TGF- β 1	/	0	/	0	/	12
- TGF- β 1/ + MIA	/	nicht gemessen	/	nicht gemessen	/	nicht gemessen
+ TGF- β 1/ + MIA	/	15	/	10	/	19
- TGF- β 1/ + MIA AS	/	nicht gemessen	/	nicht gemessen	/	nicht gemessen
+ TGF- β 1/ + MIA AS	/	0	/	0	+	17

	Tag 14		Tag 20	
	Färbung	MIA-c (ng/ml)	Färbung	MIA-c (ng/ml)
- TGF- β 1	/	0	/	0
+ TGF- β 1	+	32	+	71
- TGF- β 1/ + MIA	/	nicht gemessen	/	nicht gemessen
+ TGF- β 1/ + MIA	+	41	+	47
- TGF- β 1/ + MIA AS	/	nicht gemessen	/	nicht gemessen
+ TGF- β 1/ + MIA AS	+	48	+	31

Tab. 3.2.: Induktion von Chondrogenese und MIA Serum-Konzentration

Alle Ansätze ohne TGF- β 1 zeigten kein Signal nach Färbung der Kulturen mit Toluidin. Bei Zugabe von TGF- β 1 zeigten alle untersuchten Kulturen ein deutliches Signal ab Tag 14, bei zusätzlicher Gabe von MIA-AS schon ab Tag 7.

3.8. mRNA Analyse mittels reverser Transkription

Aus einem kleinen, einem mittleren und einem großen Chondrozytenaggregat, jeweils isoliert an Tag 3, Tag 14 und Tag 21 nach Versuchsstart, wurde mittels der RNA-Zol Methode (Fa. AMS Biotechnology) die vorhandene mRNA isoliert. Diese wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und im Anschluss einer PCR Reaktion unterzogen. Die verwendeten Primer waren spezifisch für TGF- β 1, MIA und MIA_{splice}. Die Sequenz der MIA und MIA_{splice} Primer war identisch mit den im PCR Screening verwandten. Die Sequenz des TGF- β 1 Primers wurde Exon-übergreifend gewählt und ergab ein Fragment von 448 bp.

Bei allen untersuchten Chondrozytenaggregaten - im Folgenden als klein (k, Tag 3), mittel (m, Tag 14) und groß (g, Tag 21) bezeichnet - wurden im Agarosegel Banden für TGF- β 1, MIA und sowohl MIA_{splice} generiert. Das Primerset MIA ergab in allen drei Proben eine deutliche Bande in Höhe des Molekulargewichts von 167 bp, die Amplifikationen der TGF- β 1 spezifischen Fragmente liefen im 1%igen Agarosegel in Höhe von 448 bp. Die MIA_{splice} spezifischen Banden wurden wie erwartet bei einem Molekulargewicht von 190 bp detektiert.

Dieses Ergebnis unterstützt die im vorhergegangenen Versuch festgestellte Induktion von MIA bei gleichzeitiger Expression von TGF- β 1. Ebenfalls wird die Hypothese unterstützt, dass, wie im PCR-Screening gezeigt, die Expression von MIA_{splice} mit MIA gekoppelt ist.

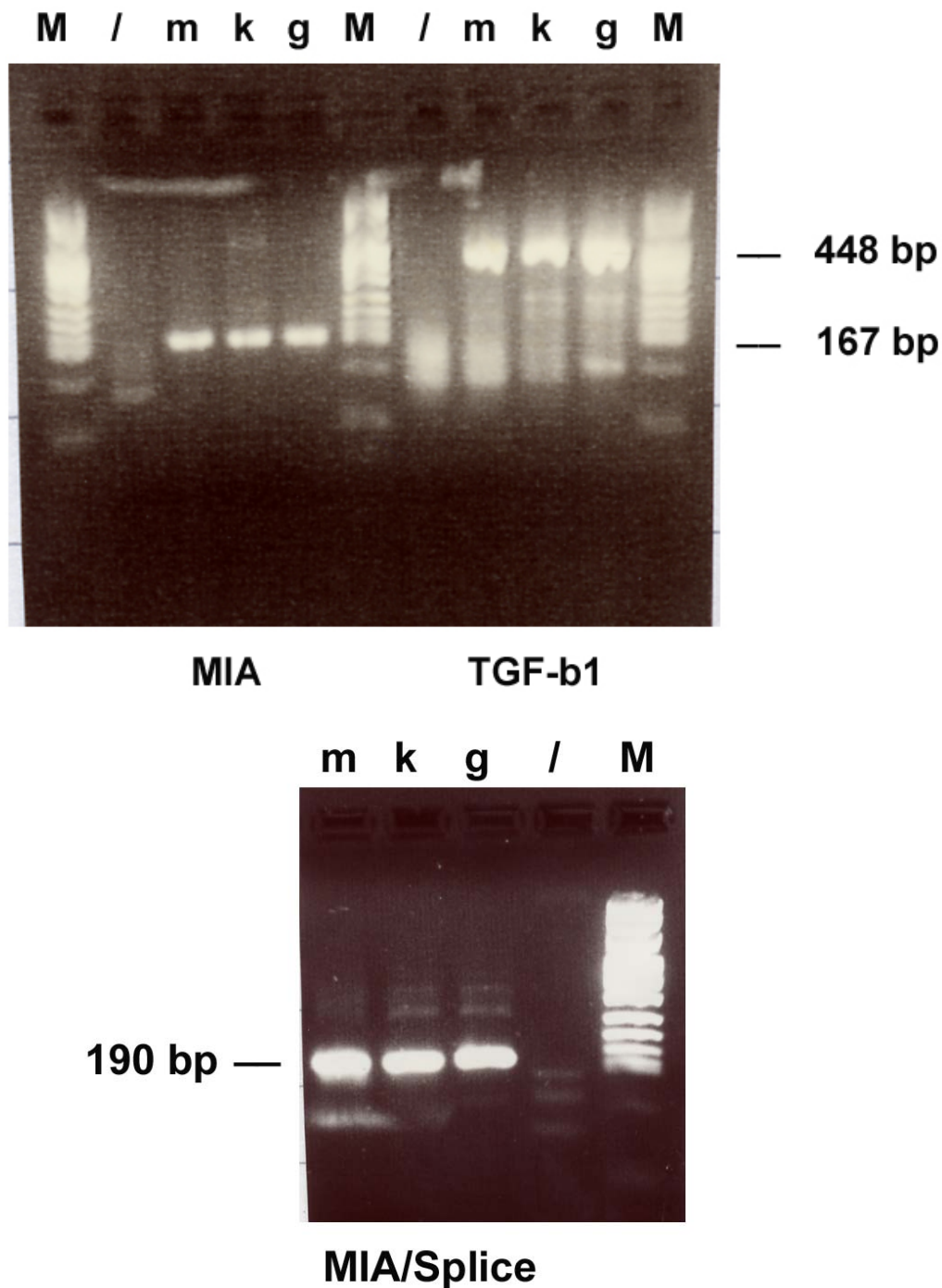


Abb. 3.13.: MIA-, TGF- β 1- und MIA_{splice} spezifische PCR Amplifikation

Nach der Isolation von RNA aus einem kleinen (k), mittleren (m) und großen (g) Chondrozytenaggregat und anschließender reverser Transkription wurde eine PCR Reaktion mit Primern für MIA, TGF- β 1 und MIA_{splice} durchgeführt. In allen drei Ansätzen waren deutliche Banden bei 448 bp (TGF- β 1), 167 bp (MIA) und 190 bp (MIA_{splice}) zu finden.

3.9. Immunhistologische Untersuchungen von MIA_{splice}

3.9.1. Untersuchung von Chondrozytenkulturen

Nachdem es durch die vorhergehenden Versuche als erwiesen angesehen werden konnte, dass MIA_{splice} in Chondrozyten sowie auch in Melanozyten vorhanden ist, wurden unterschiedliche Zellaggregate mit Hilfe der Immunhistologie untersucht. Zusätzlich wurde die Spezifität des MIA_{splice} Antikörpers bereits im Dot Blot und im Western Blot nachgewiesen, der Antikörper konnte also für die nachfolgenden Versuche verwendet werden.

Zunächst wurden humane Chondrosarkomzellen der Linie SW-1353 auf Labtec Cahmber Slides ausgesät und unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz gezogen. Nach Fixierung mit gekühltem Ethanol und einem Blockierungsschritt wurden die Zellen mit einer 1:100 fachen MIA_{splice} Antikörperlösung inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen mit Biotin gekoppelten sekundären Antikörper mit DAB.

Wie in Abb. 3.14. in der Vergrößerung zu erkennen ist, sind die Zellkerne deutlich gefärbt. In der Negativkontrolle, die derselben Prozedur unterworfen wurde, allerdings ohne Zugabe des primären Antikörpers, ist dagegen keinerlei Färbung zu erkennen.

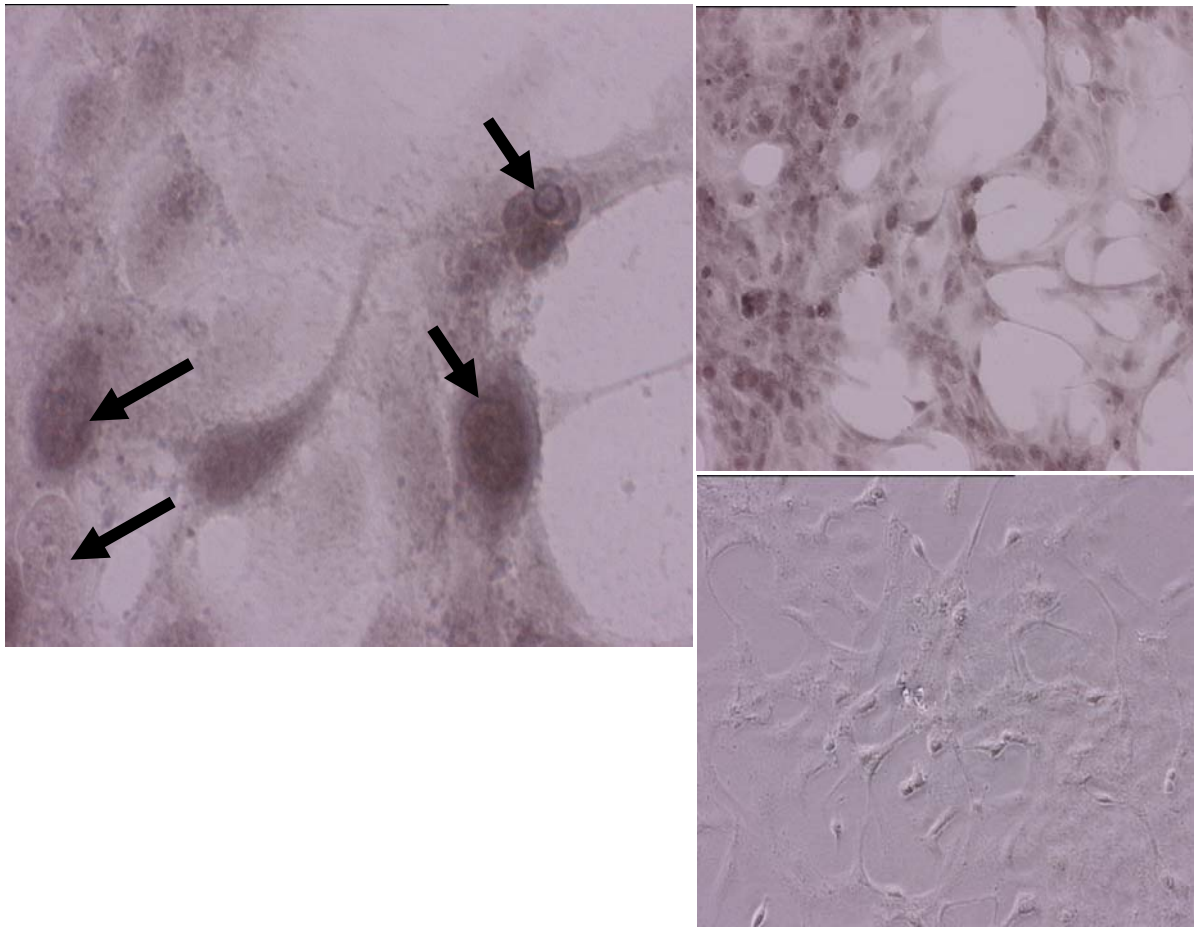


Abb. 3.14.: Immunhistochemische Färbung von Chondrosarkomzellen mit MIA_{splice}

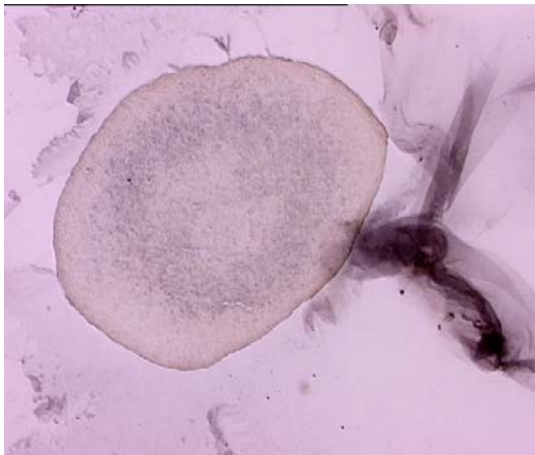
Nach immunhistologischer Untersuchung von Chondrosarkomzellen (SW-1353) konnten deutliche Färbungen im Bereich der Kernmembranen identifiziert werden (links, oben rechts), die Negativkontrolle ohne primären Antikörper hingegen zeigte keine Färbung (unten rechts).

3.9.2. Untersuchung von Chondrozytenaggregaten

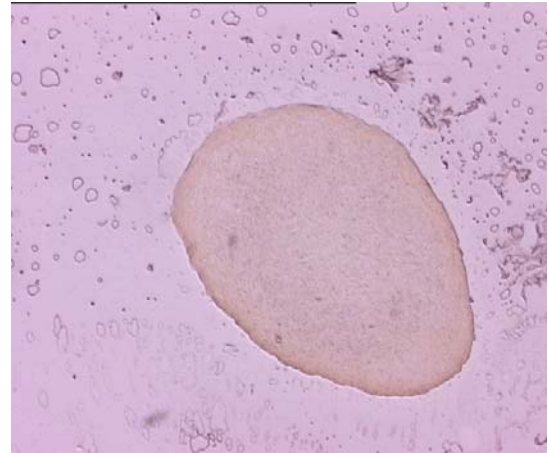
Chondrozytenaggreare aus Kulturen, die einerseits mit und andererseits ohne TGF- β 1 inkubiert worden waren, wurden an den Tagen 7 und 20 mit dem Antikörper MIA_{splice} einer immunzytochemischen Untersuchung unterzogen (wie oben beschrieben).

Das mit TGF- β 1 behandelte Aggregat zeigte am Tag 7 bereits ein deutliches Färbesignal, insbesondere im inneren Bereich des Aggregates. Die Kultur am Tag 20 zeigte fast im ganzen Aggregat starke Expression von MIA_{splice}, nur die Randbereiche waren im Gegensatz dazu geringfügig gefärbt. Die Negativkontrollen beider Tage, gezogen ohne TGF- β 1, zeigten im Gegensatz dazu keinerlei Färbung und somit keine Expression von MIA_{splice}.

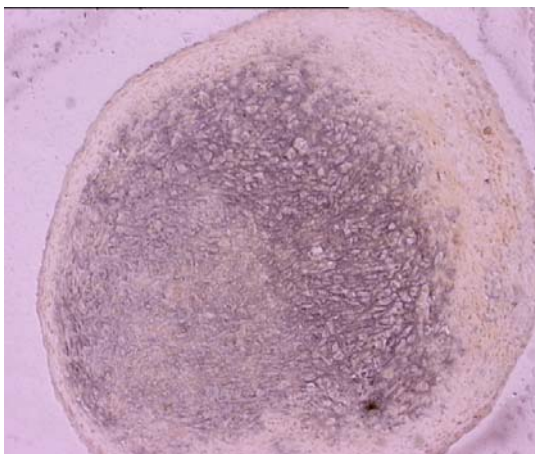
Tag 7 +TGF-beta



Tag 7 -TGF-beta



Tag 20 +TGF-beta



Tag 20 -TGF-beta

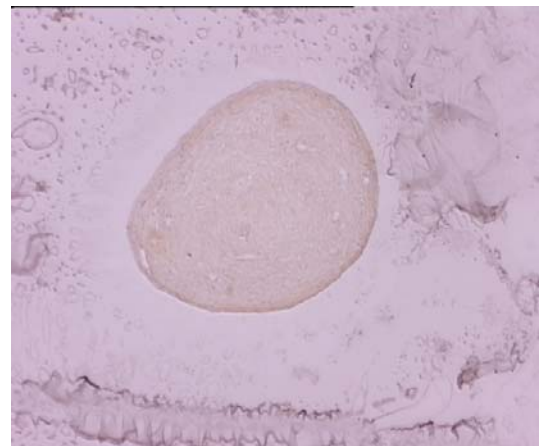


Abb. 3.15.: Immunhistochemische Färbung von Chondrozytenaggregaten mit *MIA_{splice}*

*Nach immunhistologischer Untersuchung von Aggregaten an den Tagen 7 und 20 konnte deutlich die Expression von *MIA_{splice}* gezeigt werden. Die Intensität der Signale war mit dem Zeitverlauf zunehmend. Kontrollmaterial ohne Zugabe von TGF- β 1 dagegen zeigte keine Färbung (jeweils rechts).*

3.9.3. Untersuchung von melanozytären Gewebeschnitten

Untersucht wurden die Gewebe eines Melanoms, einer Melanommetastase und zweier Naevi. Das Material wurde freundlicherweise vom Institut der Dermatologie zur Verfügung gestellt.

Das Gewebe wurde jeweils gefroren geschnitten und auf Glasobjektträger aufgebracht. Die Sektionen wurden hitzefixiert und anschließend wie bereits beschrieben immunhistologisch gefärbt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper MIA_{splice} in einer Verdünnung von 1:100 erfolgte bei 4° C ÜN, der Biotin-gekoppelte Zweitantikörper wurde in gleicher Verdünnung verwendet. Die Inkubation erfolgte bei RT für eine Stunde, die Detektion danach mit DAB.

Bei den Melanomsektionen konnte eine Anfärbung der Zellkerne des primären Tumorgewebes beobachtet werden, ebenso bei den Schnitten der Melanommetastase. Die Signale waren bei den Metastasensektionen im Vergleich teilweise noch stärker zu erkennen. In den untersuchten Naevi wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt, einmal wurden die Zellkerne angefärbt, im zweiten Fall nicht (Abb. 3.16.).

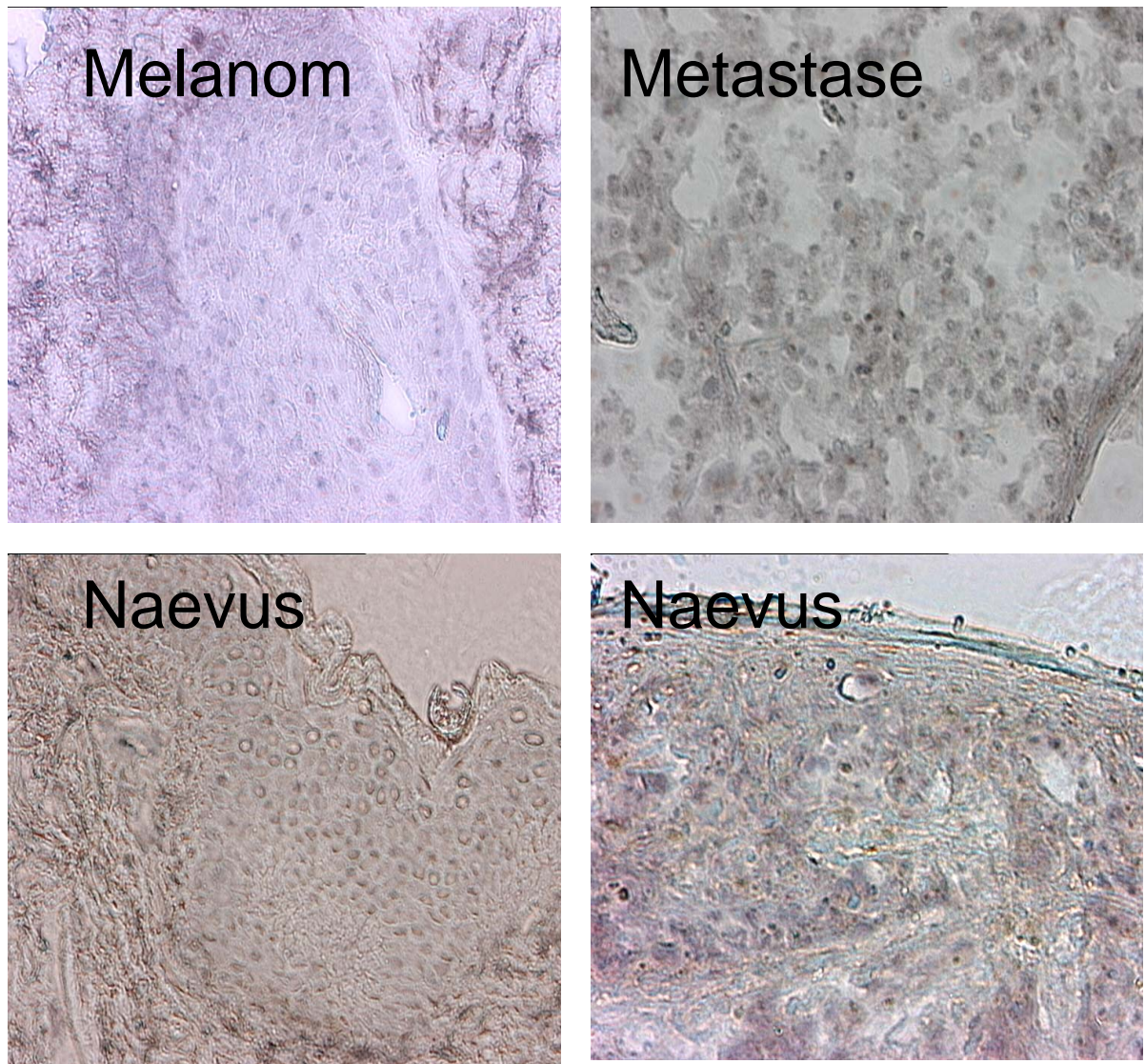


Abb. 3.16.: Immunhistochemische Färbung von melanozytären Geweben mit MIA_{splice}

Immunhistologische Untersuchungen von Sektionen eines Melanom, einer Melanommetastase und zweier Naevi zeigte eine deutliche Expression von MIA_{splice} in den beiden erstgenannten Geweben. In den Naevi kann man einmal deutliche Signale erkennen (links), im zweiten untersuchten Gewebe dagegen wird kein MIA_{splice} exprimiert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass alle Versuche mit dem Antikörper gegen MIA_{splice} eine Expression des Peptids in den Geweben nachwies, in denen auch MIA zu finden ist. Eine Ko-Expression der beiden Proteine ist somit wahrscheinlich, Untersuchungen über die Regulation müssen zeigen ob diese auch gekoppelt ist.

4. Diskussion

Aus einer Hirnmetastase mit ungewöhnlich langer Überlebenszeit wurde die Zelllinie HTZ19 etabliert. Auf der Suche nach den möglicherweise für das lange Überleben verantwortlichen, löslichen Proteinen im Zellkulturüberstand wurde MIA als das Protein mit der höchsten wachstumsinhibitorischen Aktivität gefunden (Bogdahn et al, 1986). Das Protein mit der Größe von ca. 11 kDa war hitzeresistent, säurestabil und Trypsin-sensitiv (Apfel et al, 1989). Nach Aufreinigung der Überstände konnte man *in vitro* eine deutliche Wachstumshemmung von ca. 85% bei Melanomen und Lymphozyten beobachten, die allerdings dosisabhängig war. Die Proteinkonzentration, bei der das Wachstum der Zellkultur HTZ-19 um 50% gehemmt wurde, lag bei 0,13 µg/ml. Der inhibierende Effekt ist irreversibel, nicht sättigbar, nicht zytotoxisch und durch Zugabe von Serum zum Kulturmedium teilweise antagonisierbar (Bogdahn et al, 1989).

Das Protein MIA wird im Organismus hauptsächlich während der Embryogenese bei der Knorpelbildung exprimiert, im Erwachsenen tritt es dann fast ausschließlich während der Invasion und der Metastasierung von Melanomen und Gliomen auf. Dies wurde *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen (Jachimcjak et al, 1996; 2005)

Bei Untersuchung des Proteins MIA mit Hilfe eines Southern Blots wurde ein zweites, kleineres Signal entdeckt. Nach erfolgter Identifizierung, Klonierung und Sequenzierung des Fragments zeigte sich, dass es sich dabei mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Splice-Variante des Proteins MIA handelt, dass durch den Wegfall des Exons 2 und einem darauffolgenden Frame-shift ein im Vergleich zu MIA unterschiedliches C-terminales Ende aufweist. Auch nach intensiver Literatur und Datenbank-Recherche konnte kein homologes Peptid zu MIA_{splice} gefunden werden.

4.1. Expression in E. coli

In den Versuchen, MIA und MIA_{splice} als Protein in E.coli anzureichern und danach aufzureinigen, ergab sich das Problem einer offensichtlichen Toxizität von MIA_{splice}. Dieses Phänomen wird in der Literatur mehrfach beschrieben (Woodson, 2008). Der zur Expression verwendete Bakterienstamm war E. coli[®] XL I Blue (Fa. Stratagene), was im Nachhinein gesehen sicherlich nicht die optimale Wahl war. E. coli[®] XL I Blue

ist ein Stamm, der zur Transformation und Erhaltung von DNA Plasmiden höchst effektiv ist, zur Anreicherung von einfach zu exprimierenden Proteinen ebenfalls geeignet, aber keinesfalls spezialisiert ist. Es wäre zu testen, ob eine bakterielle Expression mit einem E. coli[®] BL21 Stamm (Fa. Invitrogen) zum Erfolg führen könnte. Andernfalls wäre es möglich, eine Expression von MIA_{splice} in einem Zell-freien Expressionssystem (Fa. Promega) zu erzielen. Dabei handelt es sich um ein auf E. coli Extrakt basierendes Protein Synthese System. Die Plasmid DNA wird direkt zu dem vorgemischten Extrakt gegeben und nach relativ kurzer Inkubationszeit ist das gewünschte Protein in einer Konzentration von bis zu mehreren Mikrogramm pro Milliliter Reaktionsmischung synthetisiert. Damit wird die Sensibilität des bakteriellen Organismus gegenüber dem zu exprimierenden Protein auf elegante Weise umgangen.

4.2. Northern Blotting

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem in einem Southern Blot erstmals entdeckten Splice-Fragment von MIA tatsächlich um ein real existierendes Peptid handelt, wurde nach Gesamt RNA Isolierung zweier MIA positiver Zelllinien, HTZ-19 und HTZA-23, ein nicht-radioaktiver Northern Blot durchgeführt.

Nach Hybridisierung der RNA mit einer Sonde, die sowohl dem 5'-Ende der MIA Sequenz als auch der von MIA_{splice} homolog war und bis zur putativen Splice-Stelle reichte, unterstrich das erhaltene Ergebnis die vorhergehenden Untersuchungen. Durch die Wahl dieser spezifischen Sonde wurde sichergestellt, dass beide möglichen mRNAs bei einer Hybridisierung der Gesamt-RNA der Zellen erkannt werden konnten. Es wurden tatsächlich zwei Signale mit den vorhergesagten Molekulargewichten detektiert. Die Bande des maternalen MIA Proteins lief in Höhe von 11 kDa, was dessen Molekulargewicht entspricht, die Bande der Splice-Variante in Höhe von ca. 4 kDa. Die Intensität der Banden war unterschiedlich bei den einzelnen Zelllinien, das Verhältnis der Banden innerhalb einer Linie jedoch konstant. Dies könnte auf eine gekoppelte Expression der beiden Varianten hinweisen. Weiterhin ist es bekannt, dass die Expression von maternalen Proteinen und den dazugehörigen Splice-Varianten unter anderem stark von der Gewebeart ebenso wie des Transformationszustands der Zellen abhängig ist. Dass es sich bei diesen Intensitätsunterschieden zwischen den unterschiedlichen Zelllinien um eine Ungenauigkeit bei der Auftragung der RNA Proben handelte, kann durch den durchgeführten Abgleich mit β -Aktin ausgeschlossen werden.

Die Intensität von MIA_{splice} im Gegensatz zu MIA scheint in allen Zelllinien geringer zu sein, dies könnte ebenfalls durch eine Expressions-Kopplung der beiden Varianten erklärt werden.

Da es sich bei der RNA nur um den aktiv transkribierten Teil der Gesamt DNA der Zellen handelt, konnte somit mit Hilfe des Northern Blots nachgewiesen werden, dass es sich bei MIA_{splice} nicht nur um einen Artefakt handelt, sondern um ein tatsächliches Peptid, das in den MIA-exprimierenden Melanomzellen synthetisiert wird.

4.3. cDNA Screening

Die nächsten Untersuchungen wurden unter dem Gesichtspunkt der Korrelation der Expression von MIA und MIA_{splice} vorgenommen. Die RNA mehrerer Tumorlinien wurde deshalb in cDNA umgeschrieben und anschließend die Expression mit Hilfe von PCR Reaktionen mit MIA und MIA_{splice} spezifischen Primern visualisiert. Die Expressionsstärke wurde semiquantitativ mit der Expression des Haushaltgens GAPDH abgeglichen.

Die semiquantitative Analyse der Expression des Proteins MIA und des Peptids MIA_{splice} durch ein cDNA Screening ist insofern aussagekräftig, da es sich bei einer cDNA um das Produkt einer Rückschreibung von mRNA in DNA handelt. Man kann damit, nach einem Abgleich gegenüber eines ubiquitären Proteins, erkennen, ob und wie stark ein Protein in einer Zelle transkribiert wird. Daraus wiederum lassen sich Schlüsse auf die nachfolgende Proteinsynthese ziehen.

Die Primer dieses Experiments waren so gewählt, dass das vorwärts amplifizierende Oligonukleotid bei MIA und MIA_{splice} identisch war. Bei den rückwärts amplifizierenden Primern dagegen war die Sequenz nur teilweise mit MIA und MIA_{splice} identisch. Das 3'-Ende der Primer war über die putative Splice-Stelle gelegt, was in einer Änderung der Nukleotidsequenz resultierte. Dadurch war die Spezifität der amplifizierten Banden gesichert. Außerdem wurden die amplifizierten Fragmente sequenziert und durch die Nukleotidanordnung zweifelsfrei identifiziert.

Das Ergebnis zeigte deutlich, dass die Expression einerseits von sowohl MIA als auch von MIA_{splice} stark Gewebeabhängig ist. Nur in cDNA's melanozytärem Ursprungs konnte eine Expression beider Varianten protokolliert werden, die Kontrollgewebe

nicht melanozytärem Ursprungs zeigten kaum bzw. keine Expression, weder von MIA noch von MIA_{splice}.

Die Expression beider Proteine in gutartigen Naevi war ungleich zu früheren Untersuchungen überraschend hoch (Bosserhoff et al., 1998). Dies entspricht nicht der gängigen Annahme, dass die Expression von MIA und MIA_{splice} mit zunehmender Tumorigenität der Zellen eher ansteigt (Bosserhoff et al., 1997). Andererseits kann dieses Ergebnis durch erhöhte Zellaktivität des Organismus bei der Bildung eines Naevus hinreichend erklärt werden. Bei der Transformation einer regulären Hautzelle zur Naevus-Zelle könnten MIA und MIA_{splice} durchaus eine wichtige Rolle spielen. Dies müsste durch weitergehende, speziell auf diese Fragestellung ausgerichtete, Versuche geklärt werden.

Allgemein ließ sich in diesem Versuch keine ansteigende Tendenz der Expression bei ansteigender Tumorigenität der untersuchten Zelllinien erkennen. Das mag eventuell mit unterschiedlichen Konditionen der Linien in der Zellkultur, der Anzahl der Passagen und anderen Zellkultur-spezifischen potentiellen Artefakten zu erklären sein. Frühere Gewebeuntersuchungen haben jedoch diese ansteigende Expression bei ansteigenden Tumorstadien zumindest bei MIA bereits nachgewiesen (Bosserhoff et al., 1997).

Der einzige Trend der sich in dem cDNA Screening ebenso wie im Northern Blot erkennen ließ, war die scheinbare Kopplung der Expression von MIA und MIA_{splice}. Die Expression von MIA_{splice} war in fast allen Geweben geringer als die MIA-Expression. Dies steht im Gegensatz zu einem Grossteil untersuchter Proteine und ihren zugehörigen Splice-Varianten, denen eine Funktion in Tumoren zugeschrieben wird. In vielen Fällen wird die Tumorigenität von Zellen sowie die Metastasierung aufgrund unterschiedlich starker Expression der verschieden geSpliceten Proteine reguliert (Woodsen, 1998).

Was sich durch diesen Versuch allerdings deutlich erkennen lässt, ist die Tatsache, dass sich Gewebeuntersuchungen deutlich von Zellkultur-Ergebnissen unterscheiden können. Die bei dieser Untersuchung verwendeten RNA's wurden uns großzügigerweise von einer kollaborierenden Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Allerdings hatten wir keine Information über die der cDNA-Synthese vorausgehende Behandlung der Zellen. Das betrifft unter anderem die Zusammensetzung der Aufzuchtmedien, die Anzahl der Passagen, eventuelle Medienzusätze usw. Dies sind

somit Faktoren, die die Expression eines Proteins empfindlich beeinflussen können. Somit muss bei Versuchen wie diesem genauestens auf die Einhaltung eines allgemein angewandten Protokolls geachtet werden, damit die anschließenden Ergebnisse eine nachvollziehbare Aussagekraft haben.

4.4. Western Blot Analyse von MIA und MIA_{splice}

Nachdem die Existenz des Peptids MIA_{splice} mit Hilfe des Northern Blots auf mRNA Ebene nachgewiesen war, war die Frage, ob MIA_{splice} tatsächlich in den Zellen synthetisiert wird, eine logische Weiterführung des Nachweises. Es ist bekannt, dass sich durch alternatives Spleissen auf mRNA Ebene ein nonsense-gesteuerter Abbau der mRNA erreichen lässt, wonach das entsprechende Protein nicht synthetisiert wird (Matlin et al, 2005). Man kann also nicht zwingend aus der Existenz der mRNA der Spleiss-Variante eines Proteins auf dessen tatsächliche Existenz auf funktionell relevanter Protein-Ebene schließen.

Auf Grund des Wegfalls von Exon 2 ergibt sich ein Frame-shift der Nukleotidsequenz, der sich wiederum auf die Aminosäuresequenz des resultierenden Peptids auswirkt. Der Nachweis der Protein-Expression konnte dementsprechend mit Hilfe zweier unterschiedlich spezifischer Antikörper gegen das N-terminale und das C-terminale Ende von MIA erbracht werden.

Wie in Abschnitt 3.5. zu ersehen ist, bestätigte das Ergebnis diesen Ansatz. Der Western Blot zeigte die erwarteten Signale. Es wurden zwei Banden bei Verwendung des N-terminalen Antikörpers detektiert aufgrund der identischen N-terminalen Aminosäuresequenz von MIA und MIA_{splice}. Bei alternativer Verwendung des C-terminalen MIA-Antikörpers fehlte die MIA_{splice} Bande als Resultat der veränderten Aminosäuresequenz nach dem Frameshift.

Das Vorhandensein von MIA_{splice} in gleichzeitiger Gegenwart von MIA lässt die Vermutung zu, dass beide Proteine in gewisser Weise gekoppelt exprimiert werden. Dies ist speziell in Tumorgeweben nicht immer so, sehr häufig wird die Tumorigenität durch die unterschiedliche Expression von Splice-Varianten der beteiligten Proteine reguliert. Ein Beispiel dafür ist das MDM2 Onkogen, bei dem bis zu 40 unterschiedliche Splice-Varianten in verschiedenen Tumorarten differenziert exprimiert werden (Bartel et al, 2004). Ebenso wie bei MIA (Jachimczak et al, 2005) wurde bei diesem Protein der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden mit positiven Resultat bei

Tumorzellkulturen eingesetzt. Eine gekoppelte Expression von MIA und MIA_{splice} kann auf eine ähnliche Funktion von beiden Proteinen hinweisen. MIA_{splice} könnte die Wirkung von MIA bei der Tumorprogression unterstützen oder verstärken.

Beide Proteine, MIA und MIA_{splice} sind außer bei der Chondrogenese nur in melanozytären Geweben detektierbar. Die Expression steigt bei beiden im Laufe einer Tumorprogression an, so dass sich auch für MIA_{splice} die Möglichkeit einer Funktion der Regulation dieser Vorgänge anbietet. MIA_{splice} kann ähnlich MIA eine Rolle bei der Ablösung der Zellen von Primärtumor spielen, ebenso wie bei folgender Metastasierung der Tumors.

4.5. Induktion von Chondrogenese mit MIA und TGF- β 1

Der Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie, einer Gruppe von Zytokinen. Es handelt sich dabei um ein sezerniertes Protein, das in einigen wesentlichen Bereichen zelluläre Funktionen moduliert. Es handelt sich bei diesen Funktionen unter anderem um die Kontrolle des Zellwachstums, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose bei einer Vielzahl verschiedener Zellen, u.a. des ZNS und des Immunsystems. TGF- β 1 spielt dementsprechend eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Immunsystems. Im gesunden Organismus steuert TGF- β über das Immunsystem die Erkennung und Eliminierung von transformierten Zellen und induziert den programmierten Zelltod, die Apoptose. (Ellenrieder et al., 2002)

Tumorzellen haben zahlreiche Mechanismen entwickelt, um die Immunüberwachung des Organismus zu umgehen und eine Resistenz gegen die Induktion der Apoptose zu generieren. TGF- β 1 spielt scheinbar eine Schlüsselrolle bei diesen Prozessen. TGF- β 1 wird hauptsächlich in T-Lymphozyten (T-Zellen) exprimiert, die damit die Interleukin 2 (IL-2)-abhängige Antwort blockieren und dadurch die IL-2-abhängige T-Zell-Vermehrung unterdrücken (Kerl et al, 1986; Chen et al., 2003) können (regulatorische T-Zellen). Brandes et al. (1991) beschrieben den immunsuppressiven Effekt von TGF- β 1 in malignen Geweben. TGF- β 1 unterdrückt auch die Differenzierung von T-Zellen und die Fähigkeit naiver T-Zellen, effektive zytotoxische oder Helfer-Funktionen zu erlangen (Gorelik und Flavell, 2002).

TGF- β 1 wurde als starker Immunsuppressor in Tumorzellen beschrieben, ebenso übt es einen starken, negativen Einfluss auf das umgebende Gewebe aus. Die Proteinkonzentration in diesen Tumorgeweben ist stark erhöht (De Visser und Kast,

1999). Zusätzlich beeinflusst TGF- β 1 die Erzeugung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), inaktiviert natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) ebenso wie die Lymphokin-aktivierte Killerzell-Zelltoxizität. Dies geschieht wahrscheinlich durch die Inhibition der Sekretion von TNF- α und - β (tumor necrosis factor) (Gray et al., 1988; Ebert et al., 1999).

Im Verlauf der Knorpelentwicklung spielen TGF- β 1 und die gesamte TGF- β Superfamilie eine wichtige Rolle. Die Chondrogenese *in vitro* benötigt eine komplexe Unterstützung von Wachstumsfaktoren, Zell-/Zell- und Zell-/Matrix- Interaktionen, genau wie bei der Knorpelentwicklung *in vivo* (DeLise et al., 2000). Die Expression von Mitgliedern der TGF- β Superfamilie von Wachstumsfaktoren wurden an Knochenreparaturstellen genau wie an Orten von embryonaler Knochen- und Knorpelformation *in vivo* nachgewiesen (Horner et al., 1998; Hogan, 1996). Die Rolle der durch Mitglieder der TGF- β Familie aktivierten intrazellulären Signal-Kaskaden, die Knorpelspezifische Genexpression unterstützen, wurde ebenfalls untersucht (Watanabe et al., 2001; Nakamura et al., 1999). Bei diesen Signalkaskaden handelt es sich unter anderem um Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen, einschließlich der Subtypen p38, die extrazellulär Signal-regulierte Kinase-1 (ERK-1) und der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK).

Bei dem Protein Otoraplin handelt es sich um ein Mitglied der MIA-Familie, das eine 60%ige Homologie mit MIA aufweist. Es wird hauptsächlich in der Kochlea des Innenohrs exprimiert, außerdem in geringem Maß im fötalen Gehirn und einigen anderen Knorpelgeweben. Otoraplin scheint eine Rolle in frühen Stadien der Chondrogenese der Otic-Kapsel zu spielen. Die Otic-Kapsel umschließt den Innenohr-Mechanismus und ist nötig für die normale Innenohrentwicklung und die Hörfunktionen. Aufgrund der großen Homologie von Otoraplin und MIA und der Tatsache, dass beide Proteine während der embryonalen Knorpelbildung exprimiert werden scheint es angemessen, die Regulation von MIA während der Chondrogenese zu untersuchen.

Wie in Tabelle 3.2. zu erkennen, ist für die Induktion der Knorpelbildung *in vitro* die Zugabe von TGF- β 1 zwingend erforderlich, da in allen Ansätzen ohne den Wachstumsfaktor keine Differenzierung erkannt und durch Tuolidinfärbung nachgewiesen werden konnte. Bei Zugabe von TGF- β 1 mit und ohne MIA differenzierten die untersuchten Zellen in allen Fällen zu Knorpelmaterial, eine

deutliche Steigerung der Differenzierung konnte nur mit TGF- β 1 bei gleichzeitiger Gabe von MIA-AS erreicht werden.

Die Expression vom MIA während der Knorpelbildung wurde mehrfach beschrieben, zum Beispiel von Dietz und Sandell (1996) und Bosserhoff und Buettner (2002). Die Expression wird bei Beginn der Chondrogenese initiiert und hält während der gesamten Knorpelbildung an.

Diese Gewebe-spezifische Expression wird unter anderem durch eine funktionelle Bindestelle des Transkriptionsfaktors AP-2 (activating protein-2) im MIA Promotor-Bereich verursacht. Dies scheint das hauptsächliche cis-aktivierende Element der Transkription zu sein. Auch der Transkriptionsfaktor Sox9 scheint eine wichtige Rolle bei der Transkriptionskontrolle zu spielen; Mutationen in der SOX Bindestelle im MIA Promotor führen zu einer Reduktion der MIA-Expression, eine Überexpression von Sox9 dagegen resultiert in einem dosis-abhängigen Anstieg des MIA-Spiegels in den untersuchten Geweben.

Der Einfluss von TGF- β 1 auf die MIA-Expression in Knorpelgewebe und umgekehrt wurde bis dato noch nicht untersucht. Wie oben beschrieben ist MIA allein nicht ausreichend um die Chondrogenese zu induzieren. Die Tatsache, dass die Knorpelentwicklung bei Gabe von MIA-AS deutlich ansteigt, wirft weitere Fragen über die Funktion von MIA bei der Chondrogenese auf. Es besteht die Möglichkeit, dass MIA eine Funktion als regulatorisches Element zukommt, das in Verbindung mit TGF- β 1 die Knorpelbindung induziert. Ebenso besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass MIA und TGF- β 1 unabhängig voneinander bei der Chondrogenese aktiviert werden, was aber auf Grund der beschriebenen Funktionen beider Proteine in Tumorzellen unwahrscheinlich erscheint. TGF- β 1 wie auch MIA sind an der Manifestation und Migration der Tumorzellen beteiligt, es liegt nahe, dass deren Expression in irgendeiner Weise gekoppelt ist.

Überraschend ist bei dieser Annahme allerdings die deutlich frühere Differenzierung von Knorpelzellen im Versuchsansatz von TGF- β 1/MIA-AS, bei dem bereits an Tag 7 ein erstes Signal nach Anfärbung mit Toluidin erkennbar war. Durch die Gabe von MIA-AS wird die autogene Expression von MIA in den untersuchten Zellen unterdrückt, eine frühere Differenzierung der untersuchten Zellen würde damit auf eine Hemmung von TGF- β 1 durch MIA hindeuten. Dies wäre im Gegensatz zu der oben

diskutierten Tumor-progessiven Funktion beider Proteine eine Gewebespezifisch komplett gegensätzliche Funktion der beiden Proteine.

4.6. TGF- β 1, MIA und MIA_{splice} mRNA Analyse von Chondrozytenaggregaten mittels reverser Transkription

Bei der reversen Transkription wird die mRNA von Geweben oder Zellen mit Hilfe der PCR Technik amplifiziert. Durch die Wahl von spezifischen Primern kann dadurch gezeigt werden ob eine mRNA in einem Gewebe transkribiert wird. Es handelt sich dabei um eine allgemein bekannte Methode zum Nachweis spezifischer Genaktivität (Sambrock et al., 1987).

In diesem Experiment wurde die mRNA von kleinen, mittleren und großen Chondrozytenaggregaten untersucht. Die aus den Geweben extrahierte mRNA wurde mittels PCR in cDNA umgeschrieben, und diese danach mit spezifischen Primern für TGF- β 1, MIA und MIA_{splice} einer weiteren PCR unterzogen. Da die Primer in allen drei Fällen Exon-übergreifend gewählt wurden, können falsch-positive Signale mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis der gemeinsamen Expression von TGF- β 1, MIA und MIA_{splice} in allen untersuchten Chondrozytenaggregaten verstärkt die im letzten Punkt diskutierte Annahme, dass die Expression von MIA in Verbindung mit TGF- β 1 während der Knorpelentwicklung induziert wird. Das auch MIA_{splice} spezifische Signale in allen Chondrozytenaggregaten detektiert wurden, weist nochmals auf eine gekoppelte Expression von MIA und MIA_{splice} hin, wie auch schon bei der Untersuchung des cDNA Screenings angenommen.

4.7. Immunhistologische Untersuchungen von MIA_{splice}

4.7.1. Untersuchung von Chondrozytenkulturen

Nach dem vorhergegangenen Nachweis der Expression von MIA_{splice} in Chondrozyten war die darauf folgende Fragestellung, wo das Peptid in den Zellen lokalisiert ist.

Die untersuchten Zellen zeigten nach Inkubation mit dem spezifischen MIA_{splice} Antikörper und Detektion mit DAB ein deutliches Signal in den Zellkernen. Aufgrund

des negativen Ergebnisses der Kontrollfärbung kann man von einem spezifischen positiven Nachweis ausgehen.

Bei früheren Untersuchungen zur Lokalisation von MIA wurde festgestellt dass MIA im Zellkern von Tumorzellen gebildet und dann in den Interzellularraum sezerniert wird. Dort fördert MIA die Ablösung der Zellen indem es an Rezeptorstellen der Integrine des Typs $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ bindet (Bosserhoff et al., 2003).

Das Ergebnis dieser Untersuchung weist ebenso wie das cDNA Screening Experiment auf eine Ko-Expression von MIA und MIA_{splice} hin. Ob MIA_{splice} ebenfalls in den Interzellularraum sezerniert wird, müsste durch weitere Serummessungen untersucht werden, allerdings in Tumorgewebe. In Knorpelgewebe wurden nur sehr geringe Mengen MIA im Interzellularraum gemessen, die Funktionsweise in diesem Gewebe scheint unterschiedlich zu der in Tumorgeweben zu sein.

4.7.2. Untersuchung von Chondrozytenaggregaten

Der Versuch, MIA_{splice} im Gewebeverbund zu lokalisieren war eine logische Konsequenz des vorangegangenen Experiments. Das Ergebnis dieser histologischen Untersuchung war den Erwartungen entsprechend; Aggregate die mit TGF- $\beta 1$ inkubiert worden waren, zeigten ab Tag 7 nach Beginn des Versuchs ein deutliches Signal nach Färbung mit dem MIA_{splice} spezifischen Antikörper. Bei Aggregaten, die ohne TGF- $\beta 1$ kultiviert worden waren, konnte dagegen kein Signal für MIA_{splice} detektiert werden, auch nicht nach 20-tägiger Inkubation.

Dieses Ergebnis stärkt die Theorie, dass MIA_{splice} wie auch MIA im Knorpelgewebe erst nach Induktion durch TGF- $\beta 1$ exprimiert wird. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten der beiden Proteine in melanozytären Gewebe, wo die Expression von MIA und MIA_{splice} TGF- $\beta 1$ unabhängig erfolgt. Aber auch hier zeigt sich die gleichzeitige Expression von MIA und MIA_{splice}, was auf ein enges Zusammenspiel der beiden Proteine im Gewebeverbund hindeutet.

4.7.3. Untersuchung von melanozytären Gewebeschnitten

Abschließend wurden die Gewebe melanozytären Ursprungs auf das Vorhandensein und die genaue Lokalisation von MIA_{splice} untersucht. Es handelte sich um Gefrierschnitte eines Melanoms, einer Melanommetastase und zweier Naevi.

Aus der Färbung dieser Sektionen nach Behandlung mit MIA_{splice} Antikörper geht hervor, dass MIA_{splice} im primären Melanom und im Metastasengewebe ebenfalls in den Zellkernen vorhanden ist. Dies entspricht der Lokalisation von MIA in diesem Gewebetyp; ein weiteres Indiz für eine gekoppelte Expression der beiden Proteine. Die Signale in den metastasierenden Gewebeproben waren deutlich stärker als beim Primärtumor. Dies geht konform mit dem bereits bei MIA beschriebenen Anstieg der Expression bei zunehmender Progression des Tumors (Bosserhoff et al., 1997).

Bei der Untersuchung der Sektionen der Naevi wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten, einmal konnte ein deutliches Signal erkannt werden, das ebenfalls in den Zellkernen lokalisiert war. Im Falle des zweiten untersuchten Naevus wurde keine Färbung erzielt. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen des cDNA Screenings, wie dort diskutiert, kann dies auf Grund erhöhter Zellaktivität bei der Bildung eines Naevus erklärt werden.

Zusammenfassend scheint es nach all diesen Untersuchungen wahrscheinlich, dass MIA und MIA_{splice} im Organismus eine sehr eng gekoppelte Rolle spielen, sei es bei der Tumorprogression oder auch bei der Bildung von Knorpelgewebe. Die Funktionen scheinen aber gewebeabhängig unterschiedlich zu sein, ebenso wie das Zusammenwirken mit anderen Proteinen, so zum Beispiel mit TGF- β 1. Die Funktionsweise von MIA bei der Migration der Tumorzellen scheint relativ vollständig erklärt, der Anteil von MIA bei der Chondrogenese dagegen liegt noch im Dunkeln. Ebenso ist die genaue Wirkungsweise von MIA_{splice} in beiden Fällen bei weitem noch nicht geklärt. Zielgerichtete Versuche in dieser Richtung könnten wertvolle Aufschlüsse darüber geben und zeigen, ob MIA_{splice} ein potentielles Hilfsmittel in der klinischen Tumorprognose darstellen könnte.

5. Zusammenfassung

- Das Protein MIA wird im Organismus hauptsächlich während der Embryogenese bei der Knorpelbildung exprimiert, im adulten Stadium tritt es fast ausschließlich während der Invasion und der Metastasierung von Melanomen und Gliomen auf.
- Nach Northern-Hybridisierung der RNA mit einer Sonde, die sowohl dem 5'-Ende der MIA Sequenz als auch der von MIA/Splice homolog war und bis zur putativen Spleiß-Stelle reichte, wurden zwei Signale mit den vorhergesagten Molekulargewichten detektiert; die Bande des MIA Proteins lief in Höhe von 11 kDa, die Bande der Spleiß-Variante in Höhe von ca. 4 kDa.
- Die semiquantitative Analyse der Expression des Proteins MIA und des Peptids MIA/Splice durch ein cDNA Screening zeigte, dass die Expression von sowohl MIA als auch von MIA/Splice stark Gewebeabhängig ist. In cDNA's melanozytärem Ursprungs konnte eine Expression beider Varianten protokolliert werden, die Kontrollgewebe nicht melanozytärem Ursprungs zeigten kaum bzw. keine Expression.
- Im Western Blot wurden bei Verwendung des N-terminalen Antikörpers zwei Banden detektiert. Bei alternativer Verwendung des C-terminalen MIA-Antikörpers fehlte die MIA/Splice Bande auf Grund der veränderten Aminosäuresequenz nach einem Frameshift.
- Ein spezifischer Antikörper gegen MIA/Splice zeigte positive Signale im Western Blot, in melanozytischen Gewebeschnitten und Chondrozyten Aggregaten. Die Färbesignale des MIA/Splice Antikörpers deuten auf eine Ko-Lokalisation von MIA und MIA/Splice hin.
- Zur Induktion der Chondrogenese ist TGF- β 1 Expression zwingend erforderlich, MIA Zugabe unterstützt die Knorpelbildung. MIA Expression allein ist nicht ausreichend um die Chondrogenese zu starten.
- Die Expression von MIA und MIA/Splice scheint in allen untersuchten Geweben gekoppelt zu sein, bezogen auf die Lokalisation und ebenso auf die Expressionsstärke.
- Die Funktion von MIA/Splice liegt weiterhin im Dunkeln, die Ko-Expression mit MIA weist aber auf eine Aufgabe bei der Tumorprogression hin.

Liste der Abkürzungen

AP-2	activating protein-2
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antisense
Amp	Ampezzillin
BSA	bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
ca	circa
Cam	Chloramphenicol
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol
CO ₂	Kohlendioxid
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy)spiro [1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphate; C ₁₈ H ₂₀ ClO ₇ PN _{a2}
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DDT	Dithiothreitol
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Epicurian Coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
LB ₀	Lennox broth
mA	Milliampere
max	maximal
MIA	Melanoma Inhibiting Activity
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MOPS	Morpholinopropionsäure
mRNA	messenger RNA
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium chloride/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
NC	Nitrozellulose
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	sodium chloride-sodium citrate
Taq	Thermus aquaticus
TBE	tris borate EDTA
TBF	transformation buffer
TBS	Tris buffered Saline
TBST	Tris buffered Saline with Tween
TE	Tris EDTA
Tet	Tetrazyklin
TGF- β	transforming growth factor β
TNF	tumor necrosis factors
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolet
vol	Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YT	yeast tryptone

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Bogdahn für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Ermöglichung dieser Promotionsarbeit danken. Prof. Bogdahn hat mich trotz aller aufgetretenen Schwierigkeiten immer unterstützt und hat vor allem endlose Geduld bewiesen.

Weiters geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. A. Kurtz für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und die damit verbundene Verantwortung. Auch er hat mich nie aufgegeben und mir die Zeit gegeben, die ich zur Fertigstellung der Arbeit brauchte.

Meinen Laborkollegen möchte ich herzlich für das angenehme Arbeitsklima danken. Sie haben mich auch in Zeiten des Mißerfolgs – nicht wenige, wie wir alle wissen – an die angenehmen Seiten des Lebens hingewiesen, so daß ich die Zeit mit ihnen in bester Erinnerung behalten werde. Speziell Frau J. Tschertner war immer für mich da, sei es mit Rat und Tat, einer Aufmunterung oder einer Tasse Kaffee. Sie hat mich tapfer durch diese Zeit begleitet und meine Launen hingenommen. Liebe Ines, danke für alles, ohne Dich hätte ich das nie durchgestanden!

Die Arbeitsgruppe Kuhn sei besonders herausgehoben, deren Mitglieder mich auch in grossen Schwierigkeiten vorbehaltlos unterstützt haben. Ihnen kommt ein sehr grosser Anteil an der Entstehung dieser Arbeit zu. Hans-Georg und Christi, ohne Euch würde ich das jetzt nicht schreiben, vielen Dank!

Herzlichen Dank an die "Psychos" die sich mit mir das Labor teilen mussten. Sie haben ihr Leid klaglos getragen und mir mit vielen Dingen im Lauf der Jahre weitergeholfen.

Ein grosses Dankeschön auch an die VW-Gruppe, ins Besondere an Frau S. Ploetz. Sie waren immer mit allem zur Hand, was dringend nötig und bei mir gerade nicht vorhanden war.

Besonderer Dank gebührt meinen Verwandten und Bekannten, die mich durch die gesamte Zeit meines Studiums und dieser Promotion begleitet haben. Sie haben mich während dieser gesamten Zeit ertragen, lagen mir regelmäßig mit Ermahnungen in den Ohren und haben mich immer zum Abschluß der Arbeit angehalten. Frau S. Mendl möchte ich dabei herausheben, die mich wirklich tatkräftig unterstützt und mir oft einen "kleinen Tritt" gegeben hat. Special thanks are also going to my friend Orsi, who actually "triggered" the completion of this work.

Ein extra Dankeschön an Randall, durch den diese Arbeit erst einen Sinn bekommen hat.